

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

URIEL VINICIUS COTARELLI DE ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS
OBTIDO POR HIDRÓLISE ALCALINA PARA A INIBIÇÃO DE CULTIVOS DE
Staphylococcus aureus E HIGIENIZAÇÃO DE PRÉ E PÓS - IMERSÃO
DE TETOS DE VACAS LEITEIRAS**

CURITIBA

2010

URIEL VINICIUS COTARELLI DE ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS
OBTIDO POR HIDRÓLISE ALCALINA PARA A INIBIÇÃO DE CULTIVOS DE
Staphylococcus aureus E HIGIENIZAÇÃO DE PRÉ E PÓS - IMERSÃO
DE TETOS DE VACAS LEITEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Lucia Masson

CURITIBA

2010

Andrade, Uriel Vinícius Cotarelli de

Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós - imersão de tetos de vacas leiteiras / Uriel Vinícius Cotarelli de Andrade. – Curitiba, 2010.
85 f. : il. ; graf., tab.

Orientador: Maria Lúcia Masson

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

1. Própolis - Desinfetantes em veterinária. 2. Estafilococos áureos. 3. Segurança alimentar. I. Masson, Maria Lúcia. II. Título.

CDD 664.022

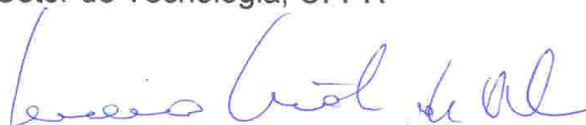
URIEL VINÍCIUS COTARELLI DE ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO DO EXTRATO
HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS OBTIDO POR HIDRÓLISE
ALCALINA PARA A INIBIÇÃO DE CULTIVOS DE *Staphylococcus
aureus* E HIGIENIZAÇÃO DE PRÉ E PÓS - IMERSÃO DE TETOS
DE VACAS LEITEIRAS**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão
formada pelos professores:



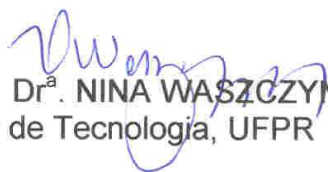
Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. MARIA LÚCIA MASSON
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. SEVERINO MATIAS DE ALENCAR
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP



Prof. Dr. SHIGEHIRO FUNAYAMA
Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, UTP



Prof.^a. Dr.^a. NINA WASZCZYŃSKYJ
Setor de Tecnologia, UFPR



Prof. Dr. LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
Campus Palotina, UFPR

Curitiba, 27 de julho de 2010.

DEDICO

**À minha esposa *Gisele Ludwig Tesserolli de Andrade*, ao meu filho
Raphael Vinicius Tesserolli de Andrade e aos meus Pais
José Eraldo de Andrade e Eliana Cotarelli de Andrade**

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos aos que de forma direta ou indireta contribuíram com a realização desta tese de doutoramento:

- Primeiramente a DEUS, por colocar na minha estrada da vida, pessoas iluminadas e amigas.
- À Professora, Doutora Maria Lúcia Masson, minha querida orientadora, pela paciência e carinho para comigo;
- Ao Professor, Doutor Shigehiro Funayama, por me ajudar a tornar real uma idéia, e dela, nascer este trabalho.
- Ao grande amigo Welington Hartmann, pela força e estímulo.
- Ao Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA), em especial ao Médico Veterinário Evandro Massulo Richter, por ceder seus animais e estrutura para realização deste trabalho.
- Um agradecimento a instituição da ESALQ- USP, em especial a pessoa do Professor, Doutor Severino Matias de Alencar, por possibilitar a realização das análises cromatográficas deste trabalho.
- À equipe do laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN/ESALQ), em especial à Adna Prado, pela paciência e colaboração.
- Ao Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná, do convênio Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - Universidade Federal do Paraná.
- Aos meus familiares, irmãos Heber, Kauana e Karen, bem como os amigos, pela força e estímulo.
- À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE QUADRO.....	XII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL.....	3
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE.....	4
2.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS.....	5
2.3 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL.....	6
2.4 MASTITE BOVINA.....	7
2.5 <i>S. aureus</i> e MASTITE BOVINA.....	10
2.6 SUPERFÍCIE DOS TETOS DE VACAS LEITEIRAS.....	15
2.7 IODO.....	21
2.8 PRÓPOLIS.....	23
2.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES NA PRÓPOLIS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 MATERIAL DE ANÁLISE.....	33
3.1.1 O Rebanho e o Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA)	33
3.1.2 Amostra de leite.....	33
3.1.3 Amostra de própolis.....	36
3.1.4 Microrganismos.....	36
3.1.5 Cromatografia.....	36
3.2 MÉTODOS DE ANÁLISE.....	37
3.2.1 Realização de higienização dos tetos, utilizando solução hidrossolúvel de própolis no manejo de Pré - imersão e Pós – imersão.....	37
3.2.2 Isolamento bacteriano e seleção de cepas de <i>S.aureus</i>	38

3.2.3	Contagem bacteriana total (CBT).....	38
3.2.4	Determinação da CCS.....	39
3.2.5	Extração e purificação da própolis de <i>Apis mellifera</i>	39
3.2.6	Tratamento da própolis	39
3.2.7	Preparo de discos impregnados com solução hidrossolúvel e etanólica de própolis.....	45
3.2.8	Concentração mínima inibitória de EHPHA.....	45
3.2.9	Análises cromatográficas	46
3.2.9.1	<i>Preparo da amostra</i>	46
3.2.9.2	<i>Silanização da amostra</i>	46
3.2.10	Cromatografia gasosa e espectrometria de massas.....	48
3.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	ISOLAMENTO BACTERIANO EM AMOSTRAS DE LEITE	50
4.2	AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE EHPHA FRENTE ÀS CEPAS ISOLADAS DE <i>S. aureus</i>	51
4.3	CROMATOGRAFIA PARA DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES COMPOSICIONAIS PRESENTES NOS EXTRATOS EHEP E EHPHA.....	56
4.4	MEDIDAS DESCRITIVAS.....	68
4.4.1	Influencia do Animal (vaca) e dos Tratamentos 1 (iodo glicerinado 5%) e tratamento 2 (EHPHA) sobre às características CCS, CBT, Log UFC/cm ² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm ² Pós-imersão dos tetos.....	68
5	CONCLUSÕES.....	75
	REFERENCIAS.....	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO E PERDAS NA PRODUÇÃO DE LEITE, ASSOCIADAS COM ELEVADAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM TANQUES (CCST).....	6
TABELA 2	DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PRÓPOLIS.....	31
TABELA 3	PURIFICAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE ESPECÍFICA ANTIBACTERIANA DO EHEP E EHPHA FRENTE À CEPA DE <i>S.aureus</i> ATCC 25923 E 88 CEPAS DE <i>S.aureus</i> ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE DAS VACAS EXPERIMENTAIS.....	52
TABELA 4	DETERMINAÇÃO DA CIM DO EHPHA FRENTE À CEPA DE <i>S.aureus</i> ATCC 25923.....	52
TABELA 5	PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHEP DE PRÓPOLIS EM CG-EM.....	57
TABELA 6	PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHPHA EM CG-EM.....	59
TABELA 7	NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N), MÉDIAS ESTIMADAS, DESVIOS - PADRÃO (DP) DAS CCS, CBT E Log UFC/cm ² REFERENTE À PRÉ-IMERSÃO E PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.	68
TABELA 8	RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DE ANIMAL (VACA) E TRATAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS CCS, CBT E REFERENTES AO Log UFC/cm ² DE PRÉ-IMERSÃO E PÓS-IMERSÃO DOS TETOS..	69
TABELA 9	TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS CCS E CBT.....	70
TABELA 10	TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS Log UFC/cm ² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm ² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.....	71
TABELA 11	TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS CCS E CBT.....	72
TABELA 12	TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS Log UFC/cm ² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm ² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.....	72

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	PATOGENESE DOS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA.....	9
FIGURA 2	PROCEDIMENTO OPERACIONAL LABORATORIAL PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO <i>Staphylococcus aureus</i> ..	11
FIGURA 3	REBANHO DE VACAS DA RAÇA JERSEY, UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.....	34
FIGURA 4	SALA DE ORDENHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	35
FIGURA 5	SALA DE ORDENHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	35
FIGURA 6	APARELHO ELETRONICO MARA MOAGEM DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS.....	40
FIGURA 7	ETAPA DE MACERAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS.....	40
FIGURA 8	FRAÇÃO RESINOSA I INSOLUVEL OBTIDO APÓS LAVAGENS SEQUENCIAIS COM AGUA DESTILADA.....	41
FIGURA 9	TRATAMENTO DA SOLUÇÃO SEMR COM SOLUÇÃO NAOH 2,5M.....	42
FIGURA 10	REPOUSO E HIDROLISE ALCALINA DA SOLUÇÃO.....	42
FIGURA 11	EVAPORAÇÃO DA SOLUÇÃO SEMR TRATADA POR HIDROLIZE ALCALINA.....	43
FIGURA 12	SOLUÇÃO RESULTANTE DA LAVAGEM COM AGUA DESTILADA.	43
FIGURA 13	FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PROPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA – EHPHA.....	44
FIGURA 14	LIOFILIZADOR UTILIZADO PARA PREPARO DAS AMOSTRAS ANTES DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS....	46
FIGURA 15	INSERÇÃO DA AMOSTRA SILANIZADA PARA INJEÇÃO NO CROMATOGRAFO GASOSO.....	47
FIGURA 16	CROMATOGRAFO GASOSO DA MARCA SHIMADZU - GC 201	48
FIGURA 17	PERFIL DOS 443 ISOLAMENTOS BACTERIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE UM REBANHO LEITEIRO DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.....	50
FIGURA 18	HALO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO POR CONCENTRAÇÕES SERIADAS DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA (EHPHA).....	54
FIGURA 19	HALO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO POR CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA (EHPHA) E EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PROPOLIS (EHEP).....	55

LISTA DE FIGURAS (Continuação)

FIGURA 20	CROMATOGRAMA REFERENTE AO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EHEP).....	58
FIGURA 21	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PROPOLIS POR HIDRÓLIZE ALCALINA (EHPHA).....	61
FIGURA 22	SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES AO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PROPOLIS POR HIDRÓLIZE ALCALINA (EHPHA) E EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PROPOLIS.....	62
FIGURA 23	MÉDIAS AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO DO Log UFC/cm ² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm ² PÓS- IMERSÃO DOS TETOS EM FUNÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO.....	73

LISTA DE QUADRO

QUADRO 1	PERFIL DOS CONSTITUÍNTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHPHA EM CG-EM, DA REGIÃO DE UNIÃO DA VITÓRIA, ESTADO DO PARANÁ.....	63
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS

APCBRH - Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa.

BPF - Boas práticas de fabricação.

CBT - Contagem Bacteriana Total.

CCS - Contagem de Células Somáticas.

CECS - Contagem Eletrônica de Células Somáticas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CG-EM - Cromatográfico gasoso com espectrometria de massas

CPRA - Centro Paranaense de Referência em Agroecologia.

CRF - Fator de reação com a coagulase.

DIM – Diluição Inibitória Mínima

EHPHA - Extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina.

EHEP - Extrato hidroetanólico de própolis.

ESALQ - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

FDA - Food and Drug Administration.

KI - Iodeto de potássio.

Nal - Iodeto de sódio.

NMC - NATIONAL MASTITIS CONCIL.

PARLPR - Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná.

UFC- Unidade formadora de colônia.

RESUMO

O mercado consumidor da maioria dos países está muito preocupado com resíduos de medicamentos utilizados para o tratamento de mastite. Dessa forma, o objetivo da presente tese de doutoramento é investigar o potencial antibacteriano de um extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, bem como determinar a redução da contagem de mesófilos da superfície dos tetos da glândula mamária. As amostras de leite foram coletadas de 12 vacas em lactação da raça Jersey, localizados nas dependências do CPRA, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, no período de janeiro a dezembro de 2009. A amostra de própolis foi adquirida de um apiário do município de União da Vitória, Estado do Paraná. Foram utilizadas cepas padrão de *S.aureus* ATCC 25923 e 88 cepas de *S.aureus* isolados de amostras de leite das vacas experimentais. As análises em cromatógrafo gasoso com espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ - USP. As amostras de swabs foram colhidas de todos os quartos mamários sob condições assépticas com prévia limpeza externa dos tetos, utilizando solução de iodo glicerinado na concentração de 0,5% no grupo 01, contendo 6 animais, e extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina (EHPHA) no grupo 02, também contendo 6 animais, totalizando 523 amostras. Nos 443 isolamentos realizados, 87,1% (386 isolamentos) eram bactérias Gram positivas, 11,9% (53 isolamentos) eram bactérias Gram negativas e 1% (4 isolamentos) eram leveduras. Os microrganismos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* spp. (33,2%), *S.aureus* (19,86%) e *Streptococcus agalactiae* (13,7%). O EHPHA apresentou um CIM de 155,46 µg/mL e grande ação inibitória sobre as cepas de *S.aureus*, com halos de inibição com média e desvio padrão de $16 \pm 0,44$ mm. Na comparação dos cromatogramas referentes ao EHEP e EHPHA, observa-se que o processo de extração por hidrólise alcalina sobre o SEMR propiciou uma purificação e conseqüente concentração dos seguintes componentes no EHPHA: Ácido benzóico, Ácido benzenopropanóico, Deoxiinositol, derivado do ácido fosfônico, derivado do ácido cetoadípico, derivado do ácido levulínico, Ácido propanóico, Ácido palmítico, Ácido hidrocínâmico. Houve a identificação de componentes comuns tanto para EHEP como EHPHA, são eles: ácido cumárico, ácido pimárico, ácido oléico, derivados silanizados de 2-metil benzofenona, derivados de vanil etileno glicol. Desse modo, a provável ação antibacteriana do EHPHA frente às cepas de *S.aureus* testadas, esta associada não à presença de flavonóides e sim, a presença de ácidos graxos e compostos aromáticos. Ambos os tratamentos apresentaram redução do Log UFC/cm², a redução do Log UFC/cm² da pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² para pós-imersão dos tetos em função do efeito de tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) foi de 31,3% (3,54 Log UFC/cm² para 2,43 Log UFC/cm²) e para o tratamento 2 (EHPHA) foi de 30,1% (3,61 Log UFC/cm² para 2,52 Log UFC/cm²). O tratamento do SEMR com hidrólise alcalina para obtenção do EHPHA permitiu que fossem possíveis as extrações de compostos hidrossolúveis. A busca pela produção alternativa de alimentos livres de químicos e agroquímicos coloca o EHPHA como uma alternativa para o manejo de pré e pós-imersão dos tetos de bovinos leiteiros.

Termos de indexação: Hidrólise alcalina, própolis, *Staphylococcus aureus*, CCS.

ABSTRACT

The consumer market in most countries is very concerned about residues of drugs used to treat mastitis. Thus, the aim of this doctoral thesis is to investigate the antibacterial potential of propolis aqueous extract obtained by alkaline hydrolysis on *Staphylococcus aureus* strains and to determine the reduction in the surface count of mesophilic bacteria the mammary gland teats. Milk samples were collected from 12 dairy cows of Jersey breed, located on the CPRA (metropolitan region of Curitiba, Parana State) in January to December 2009. The propolis sample was derived from an apiary on Uniao da Vitoria city, Parana State. Standard *S.aureus* ATCC 25923 strains and 88 *S.aureus* strains isolated from milk of experimental cows were used. Analyses by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) were performed at the Laboratory of Biochemistry, Department of Agribusiness, Food and Nutrition, ESALQ-USP. These were collected from all mammary quarters under aseptic conditions prior to external cleaning of the teats, using an iodine glycerin at 0.5% in group 1, containing six animals, and propolis aqueous extract by alkaline hydrolysis (PAEAH) in group 02, also containing six animals, totaling 523 samples. In the 443 isolations, 87.1% (386 isolates) were Gram-positive bacteria, 11.9% (53 isolates) were Gram negative and 1% (4 isolates) was yeasts. The microorganisms most frequently isolated were *Staphylococcus* spp. (33.2%), *S.aureus* (19.86%) and *Streptococcus agalactiae* (13.7%). The high inhibitory action on PAEAH presented an MIC of 155.46 $\mu\text{g} / \text{mL}$. *S.aureus* strains with inhibition zones with mean and standard deviation of $16 \pm 0.44 \text{ mm}$. Comparing the chromatograms for the EHEP and PAEAH, it is observed that the process of extraction by alkaline hydrolysis on the SEMRA provided a purification and consequent concentration the following components in PAEAH: benzoic acid, benzenopropanóico, deoxiinositol, phosphonic acid derivative, derivative acid ketoadipic and levulinic acid derivative, propanoic acid, palmitic acid, and hydroxycinnamic acid. There was the identification of common components for both EHEP as PAEAH, they are: coumaric acid, pimar acid, oleic acid, silane derivatives of 2-methyl benzophenone, derivatives of ethylene glycol Vanil. However, the presence of fatty acids esters and aromatic compounds are frequent. Thus, the probable action of antibacterial PAEAH front of *S.aureus* strains tested, is associated not with the presence of flavonoids, but the presence of fatty acids and aromatic compounds. Both treatments showed a reduction of $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$, reducing the $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ pre-immersion of the teats and $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ for post-immersion ceilings depending on the effect of treatment 1 (iodine glycerin 0.5%) was 31.3% (3.54 to $2.43 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) and treatment 2 (PAEAH) was 30.1% ($3.61 \log$ to $2.52 \log \text{CFU} \text{CFU}/\text{cm}^2 / \text{cm}^2$). The treatment of Semra with alkaline hydrolysis to obtain the possible PAEAH has allowed the extraction of water soluble compounds. The search for alternative production of food free chemicals and agrochemicals, puts PAEAH as an alternative the management of pre-and post-immersion of the teats in dairy cattle.

Keywords: alkaline hydrolysis, propolis, *Staphylococcus aureus*, SCC.

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2002). Por seu elevado valor nutritivo, é um alimento básico do crescimento, já que contém alimentos plásticos (proteínas) e energéticos (lactose e gorduras), além de cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas A e D (BACILA, 1980; MONARDES, 1998; MONARDES, 2001; MÜLLER, 2002).

A produção mundial de leite fluido foi cerca de 430,128 bilhões de toneladas em 2009, sendo: a União Européia com 133,800 bilhões de toneladas, os Estados Unidos com 85,8200 bilhões de toneladas, a Índia com 45,800 bilhões de toneladas, a Rússia com 32,500 bilhões de toneladas e o Brasil, na quinta posição, com aproximadamente 28,790 bilhões de toneladas (USDA, 2010).

O Estado do Paraná produz 2,7 bilhões de litros de leite por ano. Do total de 9,5 milhões de cabeças do rebanho do Estado, 2,5 milhões de cabeças são de aptidão leiteira, sendo que a atividade está presente na vida de 100 mil produtores e 377 laticínios com inspeção federal ou estadual ou municipal. A grande maioria da produção se concentra em pequenas e médias propriedades, sendo que a agricultura familiar responde por quase 50% da produção estadual de leite (HARTMANN, 2009).

Desde a década de 90, Costa (1998) destaca que a mastite influencia diretamente o rendimento industrial e a qualidade do leite. A mastite é uma das principais causas de prejuízo no setor de produção de leite. Estimativas feitas em vários países calculam perdas por essa enfermidade da ordem de 10 a 15% da produção, por exemplo, em 1987, os EUA perderam devido à mastite 8 bilhões de litros, o equivalente à produção brasileira naquele ano. Naquele país, os prejuízos atingem a casa dos 2 bilhões de dólares anuais.

Através de dados da literatura confirma-se que a mastite continua sendo a doença mais frequente nos bovinos leiteiros, ocasionando grandes perdas econômicas para a indústria leiteira, o que causa alterações dos seus principais componentes, e de saúde pública, pela veiculação de micro-organismos patogênicos aos humanos no leite (PHILPOT, 1998; COSTA, 1998; HALASA et al. 2007). Estima-se que em torno de 17% a 20% do rebanho leiteiro produtivo mundial

apresente mastite. A sua consequência direta é a queda da produção e a perda ou diminuição funcional de um ou mais quartos mamários, reduzindo o valor comercial do animal e aumentando gastos com tratamentos (HEESCHEN e REICHMUTH, 1995). Segundo Philpot (1998), o mercado consumidor da maioria dos países está muito preocupado com resíduos de medicamentos utilizados para o tratamento de mastite; assim sendo, todas as precauções devem ser tomadas para manter a qualidade do leite e de seus subprodutos. O grupo de medicamentos beta lactâmicos, o qual inclui a penicilina, é o que causa maior preocupação, uma vez que podem estar presentes no leite, e ser consumidos involuntariamente pela população.

A busca por alternativas naturais no combate e prevenção às doenças bacterianas vem de longa data. De acordo com os dados históricos, o uso da própolis como tratamento terapêutico natural vem de mais de 5.000 anos, cujo emprego era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. De origem grega, a palavra significa uma combinação de pró (defesa) e polis (cidade), “defesa da cidade”, neste caso, a cidade é a colméia (WIELSE, 1995; PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

A própolis é uma substância coletada pelas abelhas a partir de resina e brotos de árvores, com o acréscimo de cera (LIMA, 2006). Composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias e seu emprego na vida da colônia está relacionado com suas propriedades mecânicas e antimicrobianas, sendo utilizada na construção e adaptação da colméia e na garantia de um ambiente asséptico (FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006).

Existem descritos mais de 300 compostos identificados em diferentes amostras de própolis, com mais de 100 em cada uma, incluindo: ésteres de ácidos fenólicos, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, dihidroflavonóis, chalconas), terpenos, β -esteróides, álcoois e aldeídos aromáticos, sesquiterpenos, naftalenos; mas sua composição química não é estável, sendo determinada principalmente pelas características fitogeográficas ao redor da colméia (AHN et al. 2007; BANKOVA, 2005; MARCUCCI et al. 2001).

Diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à própolis:

antimicrobiana, antiviral, antioxidante, imunomodulatória, cicatrizante, antiprotzoária, antiinflamatória, dentre outras (SANTOS et al. 2002; HU et al. 2005; VYNOGRAD, VYNOGRAD e SOSNOWSKI, 2000). Porém, de acordo com Pinto, Faria e Message (2001), existem poucos trabalhos na literatura científica sobre o uso de extratos de própolis e/ou derivados no tratamento ou prevenção da mastite bovina ou de outras espécies domésticas.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antibacteriano de um extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*, um dos principais agentes microbianos causadores de mastite bovina, bem como determinar a redução da contagem de mesófilos da superfície dos tetos da glândula mamária.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter um extrato hidrossolúvel de própolis através de hidrólise alcalina e aplicar um extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina na higienização de pré e pós-imersão dos tetos de bovinos leiteiros.
- Verificar o potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis sobre a bactéria *S.aureus* como indicador *in vitro*.
- Verificar a atividade antibacteriana *in vivo* do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina (EHPHA) sobre as bactérias de superfície dos tetos presentes no manejo de pré e pós-imersão consorciado com iodo glicerinado 0,5%.
- Caracterizar e identificar a composição química presente no extrato hidrossolúvel de própolis por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massa (CG-EM).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE

A procura por alimentos derivados do leite é crescente no Brasil, tornando-se necessária à intensificação da produção nos rebanhos leiteiros, para que haja maior produtividade, melhor qualidade (ANDRADE, 2002).

Com a publicação da Instrução Normativa Nº 51 (IN51), editada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002) estabeleceram-se novas normas de produção e processamento de leite, como a refrigeração na propriedade e o transporte a granel, visando assegurar a melhor qualidade do leite no Brasil com a adoção de parâmetros de qualidade como a contagem bacteriana total, a contagem de células somáticas, a ausência de resíduos de antibióticos, entre outros.

Além disso, o sistema de pagamento por qualidade implantado por algumas indústrias lácteas brasileiras também demonstrou ser um importante instrumento na melhoria da qualidade (HARTMANN, 2009).

O termo qualidade é amplamente discutido nos diversos setores envolvidos com a atividade de pecuária de leite, entre eles, produtores, representantes da indústria e comunidade científica. Assim sendo, o leite para ser caracterizado como de boa qualidade, deve apresentar as seguintes características sensoriais, nutricionais, físico-químicas e microbiológicas: sabor agradável, alto valor nutritivo, ausência de agentes patogênicos e contaminantes (antibióticos, pesticidas, adição de água e sujidades), reduzida contagem de células somáticas e baixa carga microbiana (PHILPOT, 1998; MÜLLER, 2002; HARTMANN, 2009).

Nos últimos cinco anos, o Brasil tem apresentado grandes avanços em relação à qualidade microbiológica do leite produzido, principalmente após a implementação da nova legislação para o setor de lácteos. No entanto, problemas relacionados às infecções nas glândulas mamárias das vacas em produção resultam em leite não pasteurizado e refrigerado com altas contagens bacterianas totais e altas contagens de células somáticas (MÜLLER, 2002; HARTMANN, 2009).

A qualidade microbiológica do leite é um termo muito amplo e genérico e, para sua compreensão, toma-se fundamental o entendimento de alguns conceitos básicos elementares. De maneira geral, a qualidade microbiológica do leite pode ser enfocada sob dois diferentes aspectos: a qualidade industrial e o risco à saúde pública. Primeiramente, podemos apontar que os principais micro-organismos envolvidos com a contaminação do leite são as bactérias, e que vírus, fungos e leveduras têm uma participação reduzida, apesar de serem potencialmente importantes em algumas situações; Com relação às bactérias, podemos classificá-las em três categorias distintas, segundo a faixa de temperatura ótima para seu crescimento e multiplicação: bactérias psicrófilas, mesófilas e termófilas (FONSECA, 1998; HARTMANN, 2009).

Zocche et al. (2002) demonstraram que 62,5% do leite pasteurizado tipo B, da região oeste do Paraná, apresentaram entre 10^3 e 10^4 UFC/mL de leite de bactérias mesófilas.

2.2 CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS

A Contagem de Células Somáticas (CCS) é definida como o total de células presentes no leite, que podem ser do tipo epitelial ou de defesa. As epiteliais são oriundas da descamação do tecido de revestimento e secretor interno da glândula mamária (MULLER, 2002; HARTMANN, 2009).

Todavia, as células de defesa são os leucócitos, que migram do sangue para a glândula mamária quando esta sofre alguma agressão (defesa natural), como por exemplo, no caso de uma infecção. A função dos leucócitos é englobar, fagocitar os micro-organismos invasores. Logo, o monitoramento mensal da CCS serve para detectar o aumento de leucócitos presentes em amostras de leite. Do total de CCS, estes correspondem de 75% a 98% (PAULA et al. 2004).

No Brasil, a CCS foi introduzida por Newton Pohl Ribas em maio de 1991, por ocasião da inauguração do primeiro Laboratório Centralizado de Análise da Qualidade do Leite, do Programa de Análise de Rebanhos Leiteiros do Paraná (PARLPR), resultado do convênio de cooperação técnica e científica entre a Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH),

Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a McGill University de Montreal, Quebec, Canadá. Ribas, Monardes e Bajaluk (2002), trabalhando com 672.881 amostras de leite de vacas da raça Holandesa no Estado do Paraná, encontraram efeito significativo do CCS sobre a produção diária de leite, verificando que a produção de leite diminuiu de forma linear com o aumento de células somáticas. De acordo com o NATIONAL MASTITIS CONCIL (NMC) (1998), quanto maior a CCS, maiores serão as perdas em produção de leite.

Na Tabela 1, estão apresentadas as relações existentes entre o aumento da CCS e seu reflexo na produção de leite.

TABELA 1 - ESTIMATIVA DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO E PERDAS NA PRODUÇÃO DE LEITE, ASSOCIADAS COM ELEVADAS CONTAGENS DE CÉLULAS SOMÁTICAS EM TANQUES (CCST).

CCS*	QUARTOS INFECTADOS	PERDAS NA PRODUÇÃO
	NO REBANHO (%)	DE LEITE (%) ¹
200.000	6	0
500.000	16	6
1.000.000	32	18
1.500.000	48	29

* (x 1.000 céls/mL)

¹As perdas de produção são calculadas como uma percentagem da produção esperada com a CCS de 200.000 células / mL.

FONTE: NMC (1998).

2.3 CONTAGEM BACTERIANA TOTAL

A Contagem Bacteriana Total (CBT) significa a contagem do número de colônias presentes em dada amostra de leite, previamente incubada a 32°C/48h, basicamente da contaminação inicial do leite, bem como taxa de multiplicação microbiana (FONSECA, 1998).

Desde início dos anos 1990, pesquisadores, produtores de leite, veterinários e a indústria do setor lácteo, ficaram interessados na CBT como uma ferramenta

auxiliar tanto para determinar qualidade do leite como para solucionar problemas de mastite nos rebanhos leiteiros (JAYARAO et al. 2004).

A contagem bacteriana do leite cru auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha, uma vez que a ocorrência de resultados elevados pode indicar a existência de falhas generalizadas nos procedimentos de ordenha e refrigeração do leite na propriedade (SORIANO et al. 2001). Consequentemente permite inferir os prováveis efeitos adversos sobre o rendimento industrial e inocuidade do leite (FONSECA e SANTOS, 2000).

Vallin et al (2009), estudando as boas práticas de higiene de ordenha em 46 propriedades leiteiras, oriundas de 19 municípios da região central do Estado do Paraná, destacaram que as boas práticas de higiene contribuí significativamente para a melhoria da qualidade do leite independente das condições de tecnificação das propriedades rurais estudadas. Práticas simples, como o desprezo dos três primeiros jatos de leite, lavagem dos utensílios de ordenha (latões, baldes, copos coletores) com detergente alcalino clorado 2%, pré imersão com solução clorada 750 ppm em caneca sem refluxo e eliminação da água residual dos utensílios de ordenha foram suficientes para a adequação do leite fluido à IN51.

Esta é uma preocupação e uma necessidade para a indústria de derivados lácteos. Dessa forma, Philpot e Nickerson (2002) afirmaram que todo produtor deveria se esforçar para produzir leite com contagem padrão em placas inferior a 10.000 UFC/mL.

As falhas na higiene de ordenha foram comprovadas pelos resultados obtidos no estado de Goiás por Andrade (1997) e Dias Filho (1997) que indicaram procedimentos inadequados por parte dos ordenhadores e comprovaram sua relação com a qualidade do leite.

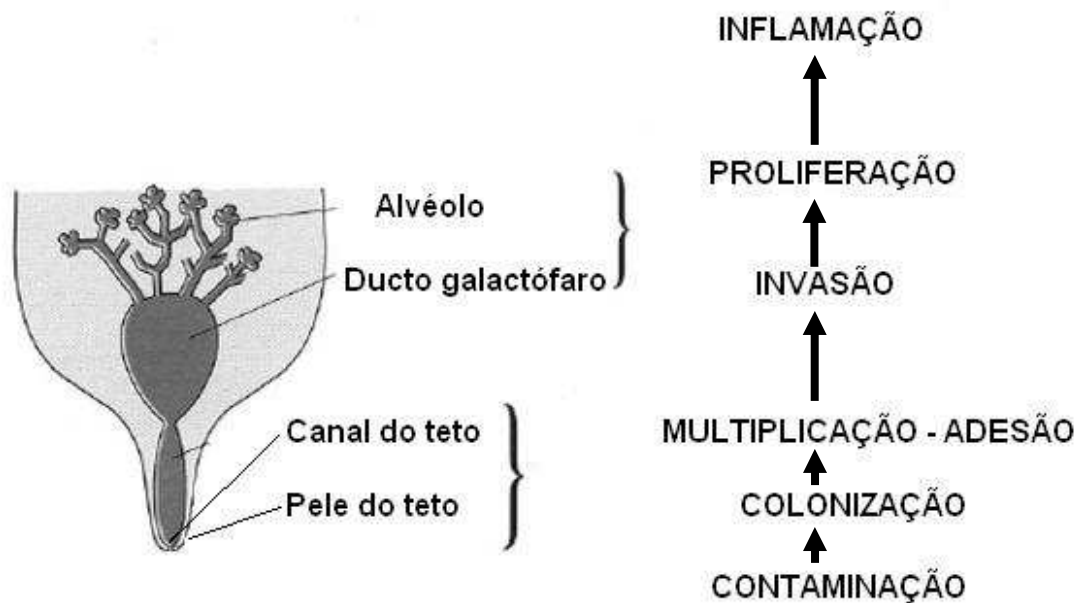
2.4 MASTITE BOVINA

Na produção e industrialização do leite, um dos fatores que mais reduz a qualidade e a quantidade do produto é a mastite. Esta é uma doença que ataca em média 15% das vacas leiteiras em todo mundo, com prevalência na ordem de 50% (GONÇALVES e KOZICKI, 1997). Em um rebanho dos Estados Unidos, a

diminuição da produção de leite associada à mastite subclínica representa de 70% a 80% de todas as perdas econômicas advindas da mastite (CARDOSO, MONSALVES e EL FARO, 2005).

A mastite consiste na inflamação da glândula mamária resultante de infecções causadas por micro-organismos que penetram de forma ascendente pelo canal do teto, possibilitando a infecção da glândula mamária e aumentando a contagem de células somáticas (CCS) (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001; MULLER, 2002; HARTMANN, 2009). Pode-se dividi-la em mastite clínica e subclínica, bem como, em mastite ambiental e contagiosa. As mastites contagiosas são as mais importantes, por acometerem o maior número de matrizes produtivas, principalmente aquelas onde o agente etiológico é *S.aureus* as quais se apresentam na forma subclínica crônica, a mais contagiosa e que não são facilmente controladas por antibacterianos (FONSECA, 1998; CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001).

Na Figura 1 observa-se o comportamento das bactérias que colonizam o teto e glândula mamária. Uma vez presente no ducto mamário, os micro-organismos promovem uma fase de colonização e multiplicação intensa e posteriormente invasão do tecido glandular mamário.



Adaptado de Gourreau et al. (2005), citado por DUMAS (2004)

FIGURA 1 – PATOGENESE DOS MICRO-ORGANISMOS CAUSADORES DE MASTITE BOVINA.

O quadro de mastite em sua maioria é subclínica, mas pode manifestar sinais clínicos avançados e evoluir para um quadro peragudo (HARMON, 1998; PAULA et al. 2004).

A forma clínica caracteriza-se por apresentar sinais visíveis, enquanto a forma subclínica exige o emprego de métodos de diagnósticos clássicos, como: contagem eletrônica de células somáticas (CECS) que é afetada, principalmente, pela infecção intramamária (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001; MACHADO, DEMETRIO e BORGES, 2003; PAULA et al. 2004) e métodos diagnósticos variados como: CMT (Californian Mastitis Test), WMT (Wisconsin Mastitis Test) (FONSECA, 1998) e imunodifusão radial (FUNAYAMA et al. 2006).

Os agentes etiológicos causadores dessa infecção são diversos, como fungos e leveduras, porém são as bactérias como *S.aureus*, *Micrococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, os

coliformes, em destaque a *Escherichia coli* e ainda, *Corynebacterium* spp., os micro-organismos mais frequentemente isolados em diversos estudos (FONSECA, 1998; CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001).

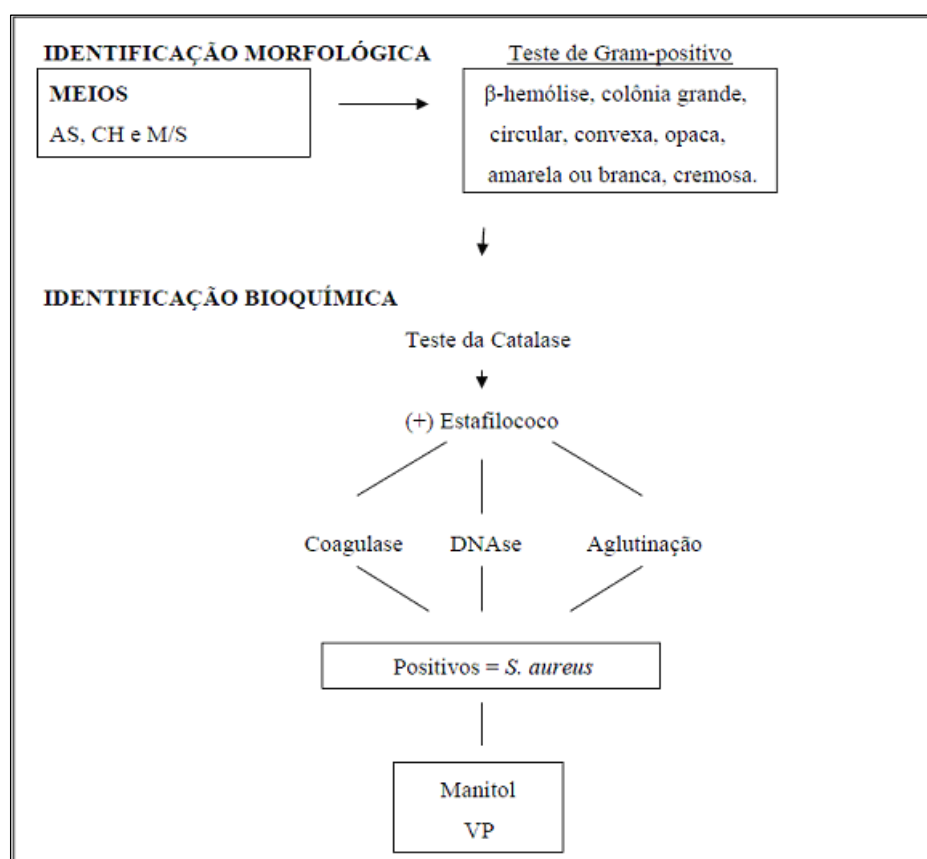
Dessa forma, a indústria leiteira vem empregando programas de controle da mastite que visam manter a glândula mamária saudável por meio de, principalmente, medidas preventivas, adoção de princípios rígidos de higiene e tratamentos estratégicos de animais doentes. Os avanços, nesse sentido, são significativos, buscando o controle e a redução significativa da infecção por *S.aureus* (BRITO, BRITO e VERNEQUEZ, 2000).

2.5 *S.aureus* e MASTITE BOVINA

O gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis, arrumados em massas irregulares ou em cachos de uva, anaeróbios facultativos ou aeróbios, catalase positivos e apresentam diversas espécies (QUINN et al. 2005). Dentre as espécies que são positivas ao teste da coagulase, *S.aureus* é a principal (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001; QUINN et al. 2005).

O isolamento e identificação dos *S.aureus* é realizado por exame direto de secreções e por meio de provas bioquímicas. A identificação dessa bactéria é feita a partir de esfregaços diretos corados com Gram, pela prova da coagulase e testes bioquímicos. *S.aureus*, sintetiza a coagulase, apresenta endonuclease, fosfatase alcalina e arginina diidrolase. Produz acetoína, reduz nitratos, maltose, frutose, sacarose, lactose, D-manitol, D-manose, D-trealose, ribose e D-turanose. Destes, a fermentação do manitol serve para diferenciar *S.aureus* de espécies como *S. epidermidis*, *S. hyicus* e *S. intermedius*. É negativo à ornitina descarboxilase, pirrolidonil arilamidase, β -glicosidase, β -galactosidase, oxidase modificada, rafinose, D-celobiose, D-xilose e L-arabinose (KONEMAN et al. 2001).

Na Figura 2, está demonstrado o procedimento operacional para identificação do *S.aureus*.



Fonte: KONEMANN (2001)

FIGURA 2 – PROCEDIMENTO OPERACIONAL LABORATORIAL PARA ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO *S.aureus*.

Nos esfregaços diretos dos isolados corados por Gram, os estafilococos aparecem como cocos Gram-positivos, com 0,5 µm a mais de 1,0 µm de diâmetro. As células são encontradas em forma de cacho de uvas, dentro ou fora de leucócitos polimorfonucleares. É provável que as variações em tamanho das células e na reação à coloração de Gram se devam à ação de células inflamatórias e de suas enzimas hidrolíticas sobre as bactérias. Quando a coloração de Gram apresenta aspectos mais típicos, pode ser emitido um informe como cocos Gram-positivos similares a estafilococos, com posterior confirmação por cultivo (KONEMAN et al. 2001; QUINN et al. 2005).

As colônias de algumas cepas de *S.aureus* podem ter pigmento amarelo ou amarelo-alaranjado, enquanto que outras podem produzir colônias esbranquiçadas ou até cinza (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001).

Algumas linhagens de *S.aureus* e outras coagulase negativas podem apresentar uma difusa zona de β -hemólise ao seu redor. Esse fato deve-se à produção de β -hemolisinas por parte das células. Os membros da Família Micrococaceae são diferenciados da Família Streptococcaceae pela prova da catalase. Esta prova detecta a presença de citocromo oxidases nas Micrococaceae. O teste é realizado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), na concentração de 3% numa lâmina. A imediata produção de efervescência indica a conversão de H_2O_2 em água e oxigênio gasoso. A prova da catalase deve ser realizada a partir de um meio de crescimento sem sangue, porque eritrócitos por si só podem produzir uma reação de catalase fraca (KONEMAN et al. 2001; QUINN et al. 2005).

Entretanto, como a maioria dos laboratórios clínicos isola estafilococos de meios não seletivos, contendo sangue, deve-se ter o cuidado de colher apenas a décima parte superior das colônias para execução da prova de catalase, evitando-se, assim, a contaminação com sangue e possíveis reações falso-positivas (KONEMAN et al. 2001; QUINN et al. 2005).

A prova da coagulase é decisiva na identificação do *S.aureus*, e pode ser feita em lâmina ou em tubo. A maior parte dos *S.aureus* possui uma coagulase única ou “fator de agregação”, na superfície da parede celular. Esse fator reage diretamente com o fibrinogênio presente no plasma e produz rápida aglutinação das células bacterianas. Esta prova pode ser executada com micro-organismos provenientes de crescimento em ágar sangue ou outros meios nutritivos não seletivos, mas não deve ser realizada a partir de meios com elevado conteúdo em sais (ágar-manitol-salgado), porque o alto teor em sais, neste caso 7,5%, induz aglutinação espontânea das células. Qualquer cepa negativa em lâmina deve ser confirmada com a prova em tubo, pois existem cepas deficientes em fator de aglutinação e usualmente produzem coagulase livre (KONEMAN et al. 2001).

Na prova em tubo, a coagulase estafilocócica detectada é secretada extracelularmente e reage com uma substância presente no plasma denominada de

“fator de reação com a coagulase”, CRF, para formar um complexo que, por sua vez, reage com o fibrinogênio, formando fibrina (KONEMAN et al. 2001).

A fermentação do manitol é outra prova muito importante, pois *S.aureus* fermenta o manitol ao contrário de outros estafilococos coagulase-negativos, como o *S. epidermidis*. Esta propriedade é utilizada em estudos epidemiológicos para detecção do *S.aureus* nos solos e nas fezes, assim como para detecção de portadores nasais. O meio utilizado é o ágar-sais-manitol, ou ágar manitol-salgado. Esse meio contém manitol 1%, NaCl a 7,5%, vermelho de fenol e peptonas. A alta concentração de sais inibe o crescimento de outros micro-organismos, com exceção de enterococos e isola de forma seletiva o estafilococo. *S.aureus* pode ser detectado pela presença de um halo amarelo ao redor das colônias, o que indica a produção de ácido a partir do manitol (KONEMAN et al. 2001).

No Brasil e na maioria dos países, *S.aureus* é a causa predominante da mastite bovina. Chi, Andrade e Ferreira (2001) estimaram que cerca de 16% das vacas são infectadas por este micro-organismo. Os estafilococos, especialmente *S.aureus*, são conhecidos por apresentarem grande resistência aos tratamentos convencionais, o que evidencia a importância do desenvolvimento de novas pesquisas sobre o controle da infecção estafilocócica na glândula mamária (FARIA, 1995).

De acordo com NATIONAL MASTITIS COUNCIL (1998), a cura da mastite por *S.aureus* ocorre somente em 30% dos casos durante a lactação.

Barbalho e Mota (2001) avaliaram os possíveis tipos de bactérias causadoras de mastite em 43 vacas, e os micro-organismos mais frequentes no isolamento foram os *Staphylococcus* spp. Estas bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. continuam sendo os agentes mais frequentemente isolados em rebanhos leiteiros, representando grande importância epidemiológica e clínica nas mastites bovinas associadas a falhas no manejo de ordenha, na prevenção e diagnóstico da mastite contagiosa dos rebanhos, em que a transmissão dos agentes causadores é predominantemente causada durante a ordenha, uma vez que o reservatório do gênero *Staphylococcus* é a glândula mamária (COSTA, 1995; CHAPAVALL e PIEKARSKI, 2000 e AMARAL et al. 2004).

Jayarao et al. (2004), utilizando 12 rebanhos leiteiros do estado da Pensilvânia (EUA), verificaram que em 126 amostras de leite de tanques refrigerados, 39 apresentaram isolamentos bacterianos de *S.aureus*. Os autores destacam ainda que este micro-organismo contribuiu para o aumento da CCS nas amostras de leite analisadas. Resultados semelhantes são descritos nos estudos de Rysanek, Monika e Babák (2009). Os autores, pesquisando a influencia de patógenos superiores sobre a contagem bacteriana total em amostras de leite de 268 rebanhos leiteiros, destacam que *S.aureus* estava presente em 32 isolamentos das amostras.

A preocupação com a contaminação dos alimentos, principalmente o leite, com os microorganismos *S.aureus* é grande. O Food and Drug Administration (FDA) relata que *S.aureus* são capazes de produzir uma enterotoxina que é extremamente estável ao calor e não é desnaturada a temperatura de pasteurização. Quando ingerido, a enterotoxina pode rapidamente produzir os sintomas que incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais, dores musculares, cefaléia e alterações transitórias na pressão arterial (FDA, 2010).

A presença de enterotoxinas produzidas pelos *Staphylococcus* spp. em um produto lácteo é de interesse da saúde pública. Uma vaca com mastite pode ser a fonte de *Staphylococcus* enterotoxigênicos dentro de um rebanho leiteiro e toda rede produtiva do leite. Este animal poderá ter sua produção posteriormente ser misturada com leite de outros produtores em tanques refrigerados para envio a indústria. O manejo de ordenha de forma inadequada, com funcionários infectados e sem treinamento específico, correlacionados com insuficientes práticas de higiene, como lavar as mãos adequadamente, desinfetar equipamentos e utensílios, possibilitam a contaminação do leite com bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. (FONSECA, 1998; FDA, 2010).

Dessa forma, *S.aureus* tem sido usado como um indicador microbiológico de sanidade dos rebanhos durante o processamento do leite. Devido a fatores ambientais, pequenas concentrações de *S.aureus* podem ser encontradas no leite não beneficiado, mesmo quando produzidos com boas práticas de fabricação (BPF).

No entanto, um número excessivo de *S.aureus* em leite cru ou outros produtos lácteos, com índices maiores ou iguais a 10^4 Unidades Formadoras de

Colônias por grama (UFC/g), indicam que o produto foi produzido sob condições sanitárias indesejáveis (FDA, 2010).

2.6 SUPERFÍCIE DOS TETOS DE VACAS LEITEIRAS

A saúde e a higiene dos tetos e úbere de vacas leiteiras são muito importantes, uma vez que, podem influenciar o nível de contaminação microbiana do leite não pasteurizado. Embora haja muitas vezes apenas uma fonte de contaminação bacteriana, altas contagens de bactérias podem também ser resultados de uma combinação de fatores (MURPHY e BOOR, 2007). Dessa forma, os procedimentos corretos de ordenha são muito importantes para evitar problemas correlacionados à mastite bovina.

De acordo com Guerreiro et al. (2005), a superfície dos tetos e da glândula mamária, durante o intervalo entre as ordenhas e enquanto as vacas estão deitadas, estão sujeitas à intensa contaminação da pele dos tetos e do úbere, principalmente se o ambiente estiver altamente contaminado. A cama ou local de permanência dos animais pode abrigar elevadas cargas microbianas, podendo atingir uma contagem bacteriana de 10^8 a 10^{10} UFC/mL. Isto pode estar associado ao contato com lama, fezes e material de cama - palhas, maravalha de madeira e areia.

Caso esses materiais fiquem aderidos aos tetos e ao úbere e não forem removidos antes da ordenha, pode ocorrer intensa contaminação do leite durante o momento da ordenha (FOX et al. 1991). Nestas condições, os principais micro-organismos isolados são estreptococos, estafilococos, micro-organismos formadores de esporos, coliformes e outras bactérias Gram-negativas (GUERREIRO et al. 2005).

Ainda, de acordo com Rasmussen, Galton e Petersson (1991) e Fonseca (1998), a desinfecção pré-ordenha pode estimular a ejeção do leite e diminuir a contagem bacteriana no leite e nos tetos, uma vez que, a ordenha de animais com tetos sujos ou úmidos está diretamente associada a uma alta CBT. Portanto, um correto manejo de ordenha, com ênfase à preparação dos tetos antes da ordenha (limpeza, pré-imersão e secagem completa dos tetos), associado a um programa de

controle de mastite, são fundamentais para a obtenção de um leite de alta qualidade (NASCIMENTO, 2007).

Assim, para manter o bom padrão microbiológico, deve-se atentar para os aspectos ligados a extração e armazenamento do leite. O produto extraído da vaca deve chegar ao local de armazenamento (latão ou tanque) com uma carga microbiana variando entre 500 e 10.000 UFC/mL (FONSECA, 1998). Um procedimento que contribui para baixa carga microbiana é a imersão dos tetos antes e depois da extração do leite.

A palavra “*dip*” é um termo da língua inglesa que significa mergulhar. Essa palavra tem-se popularizado no Brasil entre as pessoas envolvidas com a produção de leite. A expressão *pré – dipping* ou “pré-imersão” que significa imersão dos tetos em solução desinfetante antes da ordenha e, *post - dipping* ou também referenciada como “pós-imersão”, significa a imersão dos tetos após a retirada dos copos coletores (FONSECA, 1998).

A exploração moderna da pecuária leiteira envolve necessariamente a produção de leite de alta qualidade, com baixos níveis de contaminação microbiológica e a manutenção de um alto padrão sanitário do rebanho. Dessa forma, a utilização de desinfetantes na exploração leiteira desempenha uma função-chave na rentabilidade da fazenda, contribuindo para a produção de um alimento (leite) de alto padrão e para a obtenção de um estado sanitário adequado do rebanho, uma vez que a contaminação ambiental e o risco de doenças infecciosas são uma constante nos rebanhos leiteiros (FONSECA, 1998).

A desinfecção consiste no controle ou eliminação dirigida de micro-organismos considerados indesejáveis. Possui atuação em sua estrutura e em seu metabolismo, independentemente de seu estado funcional, visando prejudicar a transmissão desses micro-organismos ou reduzir sua dose infectante. A rigor, o termo desinfecção deve ser utilizado para se referir à capacidade de impedir a proliferação de micro-organismos ou eliminá-los de substâncias inanimadas ou superfícies. Já o termo anti-sepsia, refere-se à capacidade de eliminar ou impedir a proliferação de micro-organismos indesejáveis em tecidos vivos. Assim, o conhecimento do mecanismo de atuação específico de cada desinfetante é fundamental para a escolha do produto mais adequado a ser utilizado (FONSECA,

1998). O produto desinfetante geralmente é constituído de iodo (0,50 a 1,0%) ou cloro (0,1 a 4%) e pode ser aplicada por imersão da teta em uma caneca contendo a solução ou por aspersão. O excesso de desinfetante deve ser removido com toalhas de papel. Estas soluções comumente usadas para a pós-imersão são extremamente efetivas no controle da disseminação de agentes patogênicos durante a ordenha, como *S.aureus* e *Streptococcus agalactiae*, tendo pouco efeito sobre os agentes ambientais (FONSECA, 1998).

Assim sendo, o desenvolvimento de um programa efetivo de controle da mastite no rebanho implica em algumas medidas importantes, como o tratamento das vacas no período seco, tratamento dos casos clínicos, manejo adequado e bom funcionamento do sistema de ordenha. Para produção de leite com qualidade e quantidade é indispensável um úbere saudável e, para isto, deve-se tomar o máximo cuidado na pré e pós-imersão dos tetos. Mergulhar os tetos, cobrindo-os por inteiro acima da base do úbere com soluções antissépticas adequadas é uma das práticas mais importantes e indispensáveis para redução da mastite contagiosa (WATTIAUX, 2008; PEDRINI e MARGATHO, 2003).

Estudos realizados por Brito, Brito e Vernequez (2000) sobre contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, relata uma redução do número de bactérias na pele dos tetos em mais de 90% após a mamada do bezerro, se os mesmos forem cuidadosamente higienizados. A eficiência e as limitações de cada desinfetante é muito importante, uma vez que, o uso inadequado de desinfetantes ou baixas concentrações de químicos antibacterianos leva a uma seleção natural de cepas resistentes em uma população microbiana. Desse modo, a escolha dos desinfetantes tem como objetivo reduzir a população de micro-organismos patogênicos e evitar o potencial de enfermidades (FONSECA, 1998; BRITO, BRITO e VERNEQUEZ, 2000). Como não existe um agente desinfetante ideal, deve-se ter em mente algumas considerações para a escolha do desinfetante apropriado, tais como possuir amplo espectro de ação; ser atóxico e não irritante aos tecidos humano e animal; apresentar estabilidade na pele e ter custo acessível. Dos métodos microbiológicos mais conhecidos para avaliar a ação de um desinfetante temos o de lavagem ou contato com ágar e o de difusão em gel de ágar, usados para demonstrar a extensão da

destruição microbiana em superfícies, utensílios e equipamentos (HOFFMAN, GARCIA-CRUZ e VINTURIM, 1995).

A imersão dos tetos não afeta infecções existentes, porém os efeitos de pré e pós-imersão são distintos. A pós-imersão é uma estratégia direcionada, sobretudo para controlar a mastite contagiosa, especialmente a causada por *S.aureus* e *Streptococcus agalactiae*. A disseminação do *S.aureus* durante a ordenha pode estar relacionada à unidade de ordenha, material de limpeza do úbere, mãos do ordenhador e a pele da ponta do teto (FONSECA e SANTOS, 2000; WATTIAUX, 2008).

S.aureus não se desenvolve muito bem na pele do teto saudável, mas coloniza rapidamente o canal do teto se houver alguma lesão (fissuras, por exemplo) próxima ao esfíncter do teto (FOX et al. 1991; WATTIAUX, 2008). Em geral, a invasão dos micro-organismos se dá por multiplicação, movimentação ou propulsão durante a ordenha mecânica. Portanto, o número de bactérias presentes na pele do teto tem correlação direta com a incidência de novas infecções intramamárias. Os antissépticos atuam na redução dessa população e, consequentemente, diminuição no número de novas infecções.

A taxa de novas infecções intramamárias está diretamente relacionada com o número de micro-organismos causadores de mastite presentes na pele dos tetos. Sendo assim, a imersão dos tetos em produtos desinfetantes, após a retirada das unidades de ordenha, elimina a grande maioria dos patógenos e reduz os riscos de as bactérias terem acesso à glândula mamária. O objetivo da desinfecção dos tetos após a ordenha é reduzir, o máximo possível, a contaminação dos tetos após a ordenha, pois o principal mecanismo de transmissão da mastite contagiosa é a colonização da pele do teto. Cabe destacar que a contaminação dos tetos imediatamente após a ordenha é um fator desencadeante de novas infecções muito mais importante que a contaminação após 1 hora e 30 minutos da ordenha. A utilização da pós-imersão pode determinar redução de mais de 50% dos novos casos de mastite contagiosa. Existem basicamente duas possibilidades de aplicação: imersão ou spray. A imersão dos tetos é preferida por proporcionar melhor cobertura da superfície dos tetos com a solução antisséptica. Para executar-se a imersão, são usados basicamente três tipos de recipientes: frasco tipo

cachimbo, frasco de pressão com retorno e frasco de pressão sem retorno. Destes, o frasco de pressão (pressiona-se manualmente a parte inferior do tubo) sem retorno é o preferido, por manter a solução mais limpa e exigir menor força de pressão (FONSECA, 1998).

São diversas as opções de princípios ativos utilizados para desinfecção dos tetos, os mais comumente empregados incluem, desde agentes físicos como luz e calor, até várias classes de compostos químicos, tais como ácidos orgânicos e inorgânicos (ácido bórico e ácido acético), hidróxido de sódio, detergentes aniônicos (sabões), detergentes catiônicos (amônia quaternária), álcoois (álcool etílico), halogênios (iodo e cloro), compostos fenólicos e cresólicos (creolina), metais pesados (mercúrio), agentes oxidantes (permanganato de potássio), compostos orgânicos (formaldeído, clorexidina). Com objetivo de minimizar a irritação e condicionar a pele dos tetos, são utilizadas algumas bases e emolientes na formulação desses antissépticos, como a glicerina, lanolina, propilenoglicol, sorbitol, óleos vegetais, minerais e colágeno (FONSECA, 1998; SANTOS e FONSECA, 2006). Quando usados de forma adequada, os diversos desinfetantes são eficientes na redução dos casos de mastite subclínica (AMARAL et al. 2004 e BRITO, BRITO e VERNEQUEZ, 2000).

Os estudos de Brito, Brito e Vernequez (2000) sobre contagem bacteriana da superfície de tetos destacam que o procedimento de pré higienização dos tetos é muito importante e responsável por uma redução de 4,4 Log UFC/cm² para 2,2 Log UFC/cm².

Finger (2001) destacou que o efeito de pré e pós-imersão dos tetos com solução sanitizante a base de iodo foi significativo na redução de Log UFC/cm² (1,99 Log UFC/cm² para 1,35 Log UFC/cm²) mesófilos presentes na superfície dos tetos de bovinos leiteiros.

Amaral et al. (2004), utilizando 150 ppm de hipoclorito na imersão dos tetos, destacam uma redução de $5,1 \times 10^2$ para $9,4 \times 10$ UFC de *Staphylococcus* spp., uma redução de 82,8%.

Para Foret, Agüero e Janowicz (2006), em seus estudos no Chile utilizando 250 vacas leiteira da raça Holandesa e comparando um grupo de vacas sem prévia imersão dos tetos e outro grupo de vacas com iodo comercial para manejo de

ordenha verificaram uma considerável redução (24%) de novas enfermidades da glândula mamária (mastite clínica e subclínica).

O procedimento de ordenha é uma metodologia que requer atenção e empenho dos funcionários que trabalham com a retirada do leite. AMARAL et al. (2004) comentaram que várias medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites que podem ser transferidos ao leite depreciando sua qualidade microbiológica. Atenção redobrada para o equipamento de ordenha, lesões nos tetos e nas mãos do ordenhador são consideradas fatores importantes, uma vez que, que expõem a superfície dos tetos aos micro-organismos (FONSECA, 1998; AMARAL et al. 2004).

Quando se utiliza um produto de alta qualidade aplicado de forma correta, não há nenhuma contra-indicação ao uso da desinfecção dos tetos. Uma desvantagem da imersão dos tetos em antissépticos é a possibilidade de irritação, cujo grau de injúria está intimamente ligado ao produto usado e, também, a fatores ambientais. Para efeito de alerta, citamos dois pontos negativos associados à desinfecção dos tetos, quando se utiliza um produto de baixa qualidade de forma inadequada:

□ Rachadura nos tetos: dois aspectos estão relacionados à possibilidade de rachadura nos tetos: a concentração do princípio ativo e a concentração do emoliente. Quando há excesso de princípio ativo (p. ex., iodo) na fórmula, seja por má formulação ou por falta de controle de qualidade do fabricante, podem ocorrer lesões e rachaduras nos tetos. Nesse mesmo sentido, a falta ou a baixa concentração de emoliente (p. ex., glicerina ou colágeno) no produto para pós-imersão, também pode determinar a ocorrência de lesões. Dessa forma, a utilização de produtos bem formulados e produzidos por empresas que tenham alto padrão de qualidade é essencial para a otimização dos resultados.

□ Presença de resíduos no leite: esse aspecto é mais importante no que diz respeito à pré-imersão (FONSECA, 1998).

A preocupação com a presença de resíduos de iodo no leite foi relatada nos experimentos de Conrad e Hemkem (1978), que estudaram a eficiência do iodo

como agente antiséptico. Eles destacaram que o uso de iodo sobre a pele pode ser absorvido pela glândula mamária e tecido secretor do leite levando a presença residual deste químico no leite para o consumo.

No entanto, os estudos de Rasmussen, Galton e Petersson (1991), trabalhando com diferentes sistemas de manejo de pré e pós-imersão dos tetos, relatam concentrações residuais de 20 a 69 µg/L de iodo e, que a presença destes no leite é proveniente da contaminação aderida na superfície do teto e não pela absorção do iodo pelo ducto mamário.

2.7 IODO

O iodo é um químico amplamente utilizado no manejo de ordenha de bovinos leiteiros (FONSECA, 1998). É um elemento químico de símbolo I, pertencente ao grupo dos halogênios, do qual também fazem parte o flúor, o cloro, o bromo e o astato. Descoberto em 1811 pelo francês Bernad Courtois, fabricante de salitre, o elemento foi estudado por Gay-Lussac e Humphry Davy e, em 1813, batizado de iodo do grego *ioeides*, “violeta”, em alusão à coloração do vapor por ele liberado (SCHAEFER, 2009).

O iodo é encontrado em pequenas proporções (entre 1 e 50mg/kg) na água do mar, na forma de iodeto de sódio (NaI), e nos compostos petrolíferos, na forma de iodeto de potássio (KI). É extraído industrialmente das águas salgadas dos poços de petróleo e como subproduto do processo da obtenção do salitre do Chile, em cujos depósitos ocorrem na forma de iodato de sódio (NaIO₃). Está presente nos tecidos orgânico animais e vegetais em pequenas quantidades, mas é abundante nas algas marinhas, concentradoras de iodo. Pouco tóxico, o iodo está ligado à regulação das funções da tireóide no corpo humano e, em solução alcoólica (tintura de iodo), era usado como anti-séptico até que se descobriu que retardava o restabelecimento dos tecidos (SCHAEFER, 2009).

Uma das principais formas de apresentação do iodo é na forma de *iodophor*, que é uma combinação de iodo e agentes complexantes ou moléculas carreadoras como poloxâmeros, amônia quaternária e polivinil-pirrolidone (PVP). Nessa formulação, as moléculas do carreador se associam com as moléculas de iodo e

iodeto. O mesmo apresenta atividade bactericida, fungicida e virucida, atuando por meio da oxidação de compostos protéicos celulares e ácidos graxos insaturados. Apresenta ação rápida (menos de 1 minuto) e pequena irritação, e sua ação é diminuída frente à presença de matéria orgânica (FONSECA, 1998).

Os diversos processos de formulação permitem um aumento do iodo livre em produtos com baixa concentração dessa substância, sem sacrificar a atividade antisséptica da formulação. Um bom exemplo disso é que alguns antissépticos com baixa concentração de iodo, contendo menos de 0,5% de iodo se mostraram mais eficazes que alguns produtos à base de iodo a 1%. A concentração da grande maioria das formulações varia de 0,5% a 1%. O iodo destrói os micro-organismos por ação química, "queimando" a bactéria em uma reação de óxido redução. O iodo, na forma de tintura, possui ampla atividade antimicrobiana (FONSECA, 1998).

O trabalho realizado por Foret, Aguero e Janowicz (2006) mostram que o uso de solução de iodo reduz em 21% a possibilidade de novas infecções da glândula mamária de bovinos quando comparado com animais onde o iodo não foi utilizado como solução de pré e pós-imersão dos tetos.

Na utilização de iodophor à base de óleo, a eficácia é menor se comparado com os produtos à base de água. De acordo com Boddie, Nickerson e Adkinson (1993) citado por Fonseca (1998), quatro possibilidades são sugeridas para tal:

- 1) o óleo cobriria o teto protegendo a bactéria;
- 2) *S.aureus* é um agente anaeróbio facultativo, podendo se multiplicar no óleo. A produção de hemolisina é aumentada em condições de oxigênio reduzido;
- 3) algumas moléculas de iodo podem se ligar, covalentemente, ao óleo (principalmente aos insaturados);
- 4) as atividades dos produtos baseados em iodo dependem da quantidade de iodo oxidado e do coeficiente de partição entre a fase óleo e a fase água. Os produtos são anidros e teriam atividade antisséptica quando em contato com a umidade residual nos tetos.

Além disso, sua atividade é diminuída na presença de matéria orgânica, sendo efetivo no controle de novas infecções intramamárias causadas por

Streptococcus agalactiae e *S.aureus*, de acordo com Boddie, Nickerson e Adkinson (1993) citado por Fonseca (1998).

Os pesquisadores Pedrini e Margatho (2003) analisaram a ação de desinfetantes sobre alguns micro-organismos causadores de mastites contagiosa e ambiental. Eles observaram que as soluções de iodo a 2% e a 1% apresentaram melhor desempenho contra todos os micro-organismos testados. Porém, Jones (1998) relatou que soluções de iodo devem ser utilizadas em imersão dos tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), uma vez que soluções a 1% de iodo podem deixar resíduos no leite.

Foret et al. (2003), em seus estudos sobre a eficiência de produtos comerciais à base de iodo, demonstraram que o grupo que recebeu solução de iodo a 1% teve uma redução de 89,7 % das infecções causadas por *S.aureus*.

A utilização do iodo glicerinado a 0,5%, como agente desinfetante é uma prática comum nas propriedades leiteiras do Brasil, uma vez que o produto é um bom agente desinfetante e apresenta baixo custo. Entretanto, tem como desvantagem a sua pouca estabilidade, além da não observação dos produtores dos critérios de uso, sem análise do efeito residual ou da sua eficiência, o que pode interferir na qualidade do processo de desinfecção dos copos coletores de leite, fator este muito importante na prevenção da mastite (FONSECA, 1998).

2.8 PRÓPOLIS

As abelhas são classificadas como *Himenópteros*, que engloba as formigas, as vespas e as abelhas. São descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores. Durante esse processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas. São conhecidas mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam umas 40 mil espécies ainda não descobertas (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

Podem ser reunidas na superfamília Apoidea, que por sua vez é constituída por diversas famílias. A que tem hábitos sociais mais avançados, é a família *Apidae*, que possui quatro subfamílias: *Apinae*, *Meliponinae*, *Bombinae* e *Euglossinae*. As três primeiras famílias estão num estágio social avançado, a grande maioria das

outras Apoidea são abelhas solitárias ou de hábitos sociais primitivos. Entre os *Apíneos*, a única espécie que vive no Brasil é a *Apis mellifera*, introduzida no Brasil em 1839 pelo Padre Antonio Carneiro, em colônias vindas do Porto, em Portugal (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002). A população de abelhas no Brasil era de origem européia até meados de 1956. Devido à introdução das abelhas africanas em 1956 com vistas à melhoria da produção de mel e um escape acidental de abelhas rainhas, ocorreu um processo de africanização das abelhas presentes no Brasil resultando numa rápida e ampla substituição das abelhas européias pelas africanizadas (KOO e PARK, 1997).

No Brasil, as abelhas produtoras de própolis e demais produtos apícolas (mel, pólen e geléia real), são um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

O uso frequente e indiscriminado de antibióticos é o procedimento mais comumente utilizado no tratamento da mastite bovina, porém a crescente preocupação da sociedade com a presença de resíduos de antibióticos no leite e o aparecimento de estirpes bacterianas resistentes tem estimulado a busca por meios alternativos naturais que reduzam ou eliminem tais problemas (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001). Nos últimos anos, houve uma crescente e intensa procura por novas formulações farmacêuticas e dentre estes, atenção especial tem sido voltada para as plantas medicinais e para os produtos naturais, entre eles a própolis (FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006).

O uso da própolis como tratamento terapêutico natural vem de mais de 5.000 anos. As abelhas produzem a própolis para forrar os alvéolos e câmara onde as rainhas depositam os ovos e crescem as larvas. Utilizam também para vedar as entradas e orifícios da colméia. É a defesa da vida, preservando a temperatura interna da colméia e não permitindo a entrada de corpos estranhos, a fim de evitar a propagação de epidemias (WIELSE, 1995). A produção anual depende das condições de ambiente e florada, são produzidos aproximadamente de cada colméia entre 100 a 300 gramas de própolis por ano (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas *Apis mellifera*, a partir de várias gemas e cascas de árvores e arbustos e misturados com cera de abelha (MORENO et al. 2000; MARCUCCI et al. 2001; AHN et al. 2007 e BANKOVA, 2005). No geral, a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo de vegetais, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias substâncias (WIELSE, 1995).

Dessa maneira a composição da própolis é um reflexo direto da flora vegetal da qual se servem as abelhas (RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002). As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, e esta provavelmente é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exsudatos e menos importante, botões florais) e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha, conjunto este que exerce uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas. Somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, assim como, até certo ponto, a habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002).

A própolis é considerada um material quebradiço quando frio e se torna maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 – 70 °C sendo que pode atingir em alguns casos, até 100 °C. Possui colorações diferenciadas, influenciadas pela procedência e pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo da flora de origem e idade da planta (BURDOCK, 1998).

Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra. Segundo Park, Ikegaki e Alencar (2000), as propriedades biológicas da própolis tem sido atribuídos à composição da própolis, uma vez que, esta é constituída de diversos compostos fenólicos presentes e distribuídos pelo reino vegetal.

Estes compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático, são

representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BANSKOTA et al. 1998; BURDOCK, 1998). A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam, em parte, a grande variedade das propriedades biológicas de amostras de própolis. Assim sendo, as atividades biológicas são provavelmente devido a uma mistura de vários compostos. Estas substâncias na própolis são representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, derivados do ácido cinâmico e grupos de terpenóides, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (KOO e PARK, 1997; BANSKOTA et al. 1998; PARK et al. 1998; ALENCAR 2002; MACIEJEWICZ, 2001; FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006).

Os flavonóides são considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois e cetonas. De acordo com Cabral (2008), a presença e a quantidade de flavonóides em amostras de própolis no Brasil é discutível, uma vez que as própolis brasileiras têm uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos.

Alguns autores sugerem que as fontes prováveis para a própolis brasileira podem ser principalmente *Baccharis* spp., e *Araucaria* spp. (BANSKOTA et al. 1998).

Nos estudos de Alencar (2002), foram realizadas análises cromatográficas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os autores descrevem uma relação direta entre um grupo de própolis do sul do Brasil e amostras de própolis oriundas do Uruguai, Argentina, China e Estados Unidos com resina de *Populus alba* (álamo). Segundo Cabral (2008), a composição heterogênea da própolis apresenta os seguintes grupos químicos:

- a) ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e ésteres derivados (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- b) álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenilico, isobutenol, benzílico);
- c) hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanohexanos);

- d) ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oleico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);
- e) ácidos aromáticos (benzóico, cafeico, cinâmico, cumáricos (-*o*, -*m*, -*p*), ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e ésteres aromáticos derivados (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);
- f) flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferid; 3, 7,4', 5'tetrametil éter da quercetina);
- g) cetonas (acetofenona e seus derivados);
- h)aldeídos (benzaldeído, aldeído capróico, vanilina, isovanilina, *p*-hidroxibenzaldeído);
- i) flavononas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butirato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobina);
- j) chalconas e diidrochalconas (de alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, pinostrombina);
- l) terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno, β -bisabolol, 1,8-cineol, derivados de clerodane, derivados do labdane, β -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);
- m) esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);
- n) aminoácidos (alanina, β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina, tirosina);
- o) açúcares (*d*-ribofuranose, *d*-frutose, *d*-glucitol, *d*-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);

- p) lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);
- q) vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);
- r) minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

Destaques para atividades biológicas têm sido relatados para o extrato etanólico de própolis como antibacteriano, antiinflamatório, antiviral, antifúngica, anestésica, imunoestimulador, antitumoral e citotoxicidade atividades (AGA et al. 1994; FERNANDES et al. 1997; MATSUNO, CHEN e BANET, 1997; MENEZES et al. 1997; MIRZOEVA, GRISHANIN e CALDER, 1997; BANKOTA et al. 1998; BIANCHINI e BEDENDO, 1998; PARK et al. 1998; PARK e IKEGAKI, 1998; BARIZON et al. 1999; GOULART, LOPES e MARTINEZ, 1999; KUJUMGIEV et al. 1999; VYNOGRAD, VYNOGRAD e SOSNOWSKI, 2000; FERNANDES et al. 2001; ALENCAR, 2002; RUSSO, LONGO e VANELLA, 2002; SANTOS et al. 2002; HU, 2005; MENEZES, 2005; FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006 e ANDRADE et al. 2009).

Goulart, Lopes e Martinez (1999), estudando a atividade “*in vitro*” do extrato etanólico de própolis (EEP) em diferentes diluições, sobre várias espécies bacterianas, entre elas *S.aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, demonstraram que a própolis apresentou atividade antimicrobiana “*in vitro*”, dependendo da espécie e da amostra bacteriana estudada.

Rhajaoui et al.(2001), descrevem em seus estudos, que as amostras de própolis possuíam uma concentração inibitória mínima (CIM), que é definida como a menor concentração que inibe totalmente o crescimento bacteriano após incubação a 37°C por 24 horas (NCCLS, 1997), de 31 µg/mL para extrato.

Porém, o resultado encontrado por Hegazi e Abd el Hady (2001) que estudaram amostra de própolis no Egito, encontraram uma CIM de 2800 µg/mL para inibição da bactéria *S.aureus*.

De acordo com Barizon et al. (1999), estudando a atividade da própolis em solução alcoólica, por meio da técnica de diluição inibitória máxima (DIM),

demonstraram que o valor da DIM para *Micrococcus luteus* foi 1:80 (própolis em solução alcoólica) e para *S.aureus* foi de 1:40 (própolis em solução alcoólica).

Menezes et al. (1997), utilizaram amostra de própolis de São Paulo (Brasil) e relataram que extratos etanólicos de própolis têm ação frente à cepa *S.aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

Fernandes et al. (2001), utilizaram amostras de própolis de São Paulo (Brasil) e Pernambuco (Brasil) e demonstraram que tanto própolis coletadas por abelhas *Apis mellifera* quanto coletadas por várias espécies de Meliponídeos também apresentavam atividade frente a *S.aureus*.

Park et al. (1998) verificaram ação da própolis de Minas Gerais (Brasil) frente a *Streptococcus mutans*, uma bactéria comum da microbiota bucal e constataram a presença de flavonóides pinocembrina e galangina.

Santos et al. (2002) relataram que a ação da própolis de Minas Gerais (Brasil) têm atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias anaeróbicas isoladas de pacientes com periodontite, possuindo uma CIM entre 64 e 256 µg/mL.

Kujumgiev et al. (1999) evidenciaram não haver diferenças nas atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais de própolis de origens geográficas diferentes, entre elas: Albânia, Bulgária, Mongólia, Egito, Ilhas Canárias e quatro amostras brasileiras de *Apis mellifera* e duas de Meliponídeos (*Melipona compressipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*).

Bianchini e Bedendo (1998) utilizaram uma suspensão de própolis (de origem não relatada) obtida por trituração de 100g de própolis bruto em 1 litro de água destilada, por 1-2 minutos e demonstraram que extratos hidrossolúveis de própolis têm efeito sobre bactérias fitopatogênicas inibindo totalmente o crescimento de *Agrobacterium tumefaciens* e *Xanthomonas axonopodis*, sugerindo seu uso em potencial para o controle de doenças de plantas de etiologia bacteriana.

Funayama, Werner e Andrade (2006), estudando uma variedade de própolis do município de Tijucas do Sul, Estado do Paraná, destacaram que o EHPHA apresentou uma CIM de aproximadamente 291 µg/mL para *S.aureus*.

Bezerra e Gonçalves (2009), preparando formulações farmacêuticas a base de própolis de Minas Gerais (Brasil) para o combate a acne, relataram que a inibição do crescimento de cepas de *S.aureus* ocorreu a partir das concentrações de 0,0075

g/mL. A partir dessas atividades, a ação antibacteriana é a mais amplamente investigada e as diferenças entre os extratos alcoólicos são devido a alguns fatores, como espécie de abelha, a origem de própolis, extrato de preparação e bactérias testadas (FERNANDES et al. 1997; MATSUNO, CHEN e BANET, 1997; MIRZOEVA, GRISHANIN e CALDER, 1997; MORENO et al. 2000; ALENCAR 2002 e FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006).

2.9 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS PRESENTES NA PRÓPOLIS

A extração dos princípios ativos da própolis pode ser feita com processos que utilizam água como líquido extrator (MATSUNO, CHEN e BANET, 1997; PARK e IKEGAKI 1998) ou solventes orgânicos como etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila ou misturas de solventes (AGA et al. 1994; FERNANDES et al. 1997; KOO e PARK 1997; MATSUNO, CHEN e BANET, 1997; MIRZOEVA, GRISHANIN e CALDER, 1997; BANKOTA et al. 1998; BURDOCK 1998; PARK et al. 1998; PARK e IKEGAKI 1998; KUJUMGIEV et al. 1999; MORENO et al. 2000; MACIEJEWICZ, 2001; FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE, 2006 e ANDRADE et al. 2009). Após o processo de extração, torna-se necessária a concentração do extrato e retirada dos diferentes solventes utilizados, uma vez que, apenas alguns solventes são não-tóxicos e podem ser usado com segurança para aplicações internas e externas com os seres humanos e animais. Assim sendo, a redução ou eliminação do solvente pode ser realizada por liofilização, vácuo, por evaporação ou destilação (FAO, 1996).

BANKOVA et al. (1992), estudando a relação da composição fenólica e planta de origem, utilizaram a evaporação para concentração dos componentes de extrato de própolis produzida na Bulgária e Mongólia. Da mesma forma, Santos et al. (2003), verificando a eficiência antibacteriana de diferentes métodos de extração de própolis, em variadas alcoolaturas, utilizaram estufa na temperatura de 37°C, com objetivo de evaporar qualquer resíduo de álcool presente em suas amostras, evitando assim qualquer possibilidade de interferência do solvente sobre o crescimento bacteriano.

Funayama, Werner e Andrade (2006), em seus estudos sobre o comportamento de um extrato hidrossolúvel de própolis sobre *S.aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizaram evaporação por aeração. Porém, Eshraghi e Valafar (2008), estudando o comportamento de uma própolis de origem iraniana, sobre *Nocardia asteroides*, utilizaram a evaporação em fluxo laminar.

Assim, o interesse demonstrado para obtenção de preparações de própolis com composição química definida aumentou por causa das amplas possibilidades de aplicações médicas. Porém, a grande variedade na composição química da própolis gera problemas em relação ao seu uso na medicina e ao controle de qualidade (BANKOVA, 2005).

Na Tabela 2, estão compilados alguns métodos de extração em diferentes solventes extratores utilizados pela comunidade científica.

TABELA 2 – DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PRÓPOLIS.

METODOLOGIA EMPREGADA NA EXTRAÇÃO	AUTOR	ANO
Própolis (1 g), cortadas em pedaços, foi extraído com 10 mL de metanol em ebulição por 2 h. Água (2 mL) foi adicionado ao extrato filtrado e extraído 3 vezes com éter etílico. O extrato foi evaporado.	BANKOVA et al.	1992
Extratos etanólicos preparados triturando 50 g de amostra em 100 mL de etanol 96 °GL.	FERNANDES et al.	1997
Extratos etanólicos preparados com 2 gramas de própolis em 25 mL de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C.	KOO e PARK	1997
Extratos etanólicos preparados utilizando 100 g de amostra e 200 mL de etanol 95% em um banho com agitação por 1 semana a 25 °C.	MENEZES et al.	1997
Extratos etanólicos preparados com 2 gramas de própolis em 25 mL de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C.	PARK et al.	1998
Extrato aquoso de própolis obtida com 100 g de própolis triturada em 1 litro de água destilada por 1-2 minutos.	BIANCHINI e BEDENDO	1998
Testaram as atividades biológicas de extratos etanólicos de própolis obtidos com etanol 70% (1:10 p/v) por 24 horas.	KUJUMGIEV et al.	1999
Extratos etanólicos preparados com 30 g de própolis com 100 mL de álcool etílico 95°, utilizaram agitação moderada e temperatura ambiente, deixando os extratos em agitação por sete dias.	BOSIO et al.	2000
Obtiveram os extratos com etanol 70% mas realizaram a reextração após 24 horas.	HEGAZI e ABD EL HADY	2001
Extratos etanólicos preparados na proporção de cada grama de amostra utilizaram 15 mL de etanol 80% e agitação contínua por 24 horas a temperatura ambiente.	MORENO et al.	2000
Extratos etanólicos preparados com 30 g de própolis com 100 mL de álcool etílico 95°, utilizaram agitação moderada e temperatura ambiente.	SFORCIN et al.	2000
Extratos etanólicos preparados com 100 g de amostra para cada 100 mL de etanol 95% em temperatura ambiente por dois dias.	FERNANDES et al.	2001

TABELA 2 – DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DOS PRINCÍPIOS ATIVOS DE PRÓPOLIS (CONTINUAÇÃO).

Utilizaram extratos metanólicos de própolis onde 50 g de amostra foi extraída em aparelho de Soxhlet com metanol à quente por 8 horas.	MARCUCCI et al.	2001
Utilizaram própolis submetida a um fracionamento sequencial, utilizando-se os seguintes solventes extratores: segundo uma ordem decrescente de polaridade: água, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio, numa concentração de 10% (p/v).	PINTO, FARIA e MESSAGE	2001
Utilizou 2g de amostra e 15 mL de etanol em Banho Maria à 70°C, por 30 minutos, em agito constante. Este foi centrifugado e ao resíduo, adicionado 10 mL de etanol 80% com nova extração. O extrato foi resultado da somatória dos dois sobrenadantes das extrações.	ALENCAR	2002
Extratos etanólicos preparados com 2 gramas de própolis em 15 mL de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C.	PARK et al.	2002
Utilizaram 5g em 100mL de etanol 70% submetido a ultra-som por 30 minutos.	KARTAL, KAYA e KURUCU	2002
Utilizaram 100 g de amostra e 200 mL de etanol 95% em um banho com agitação por 1 semana a 25 °C.	MIORIN et al.	2003
Testaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos obtidos com 50g de amostra e 5 volumes de água destilada, agitação a 20 °C por um dia e uma reextração do resíduo por mais um dia.	NAGAI et al.	2003
Extrato etanólico obtido em temperatura ambiente por 24 horas.	KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA	2004
Extrato etanólico, sendo para cada 250 g de própolis, 600 mL de etanol 75%. Extrato hidrossolúvel, sendo resultante do tratamento do extrato etanólico por hidrólise alcalina.	FUNAYAMA, WERNER e ANDRADE	2006
Extratos etanólicos de própolis (EEP) preparados a partir da adição de etanol 80% (v/v) à própolis bruta macerada, na proporção de 1:3 (p/v). A extração foi feita a 60 °C por 30 min e sob agitação constante. Extrato seco de própolis (ESP), o sobrenadante obtido foi evaporado a baixa pressão em rotaevaporador.	CASTRO	2007
Extratos etanólicos preparados com 100 g em 400mL de etanol 80%, em Banho Maria à 70°C, por 30 minutos, em agito constante.	CABRAL	2008
A quantidade utilizada de própolis foi de 20g para 400mL de etanol absoluto.	BEZERRA e GONÇALVES	2009
Extrato etanólico, sendo para cada 250 g de própolis, 600 mL de etanol 75%. Extrato hidrossolúvel, sendo resultante do tratamento do extrato etanólico por hidrólise alcalina com pH ajustado em 7,5 por 20 horas.	ANDRADE et al.	2009
Utilizaram 10 mg de própolis em etanol (concentração não divulgada) e evaporada a 50°C.	KUMAR et al.	2010

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ANÁLISE

3.1.1 O Rebanho e o Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA)

O rebanho utilizado neste experimento, pertence ao Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA), que teve sua origem em 2004, quando da criação da Área de Preservação Ambiental do Irai, localizada na Região Metropolitana de Curitiba e que abriga a Represa do Irai, um dos principais reservatórios de água para Curitiba e municípios vizinhos. Este é constituído de 27 vacas leiteiras, em diferentes estágios de lactação, sendo 9 vacas da raça holandesa e 18 vacas da raça Jersey (CPRA, 2010).

Considerando o crescente interesse da sociedade por uma alimentação livre de venenos e a necessidade de desenvolver políticas públicas de preservação ambiental, o Governo do Estado optou por criar uma autarquia, vinculada à Secretaria da Agricultura, com a atribuição básica de desenvolver atividades de pesquisa, ensino e extensão voltadas a agroecologia e à agricultura orgânica. Assim, em 28 de dezembro de 2005, a Assembléia Legislativa do Paraná aprovou, por meio da Lei 14.980, a criação do Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. Desde então, o CPRA vem divulgando os princípios e os benefícios da agricultura ecológica e capacitando agricultores, técnicos e estudantes sobre os vários aspectos que envolvem o planejamento, a implantação e a condução de sistemas agrícolas com bases ecológicas (CPRA, 2010).

3.1.2 Amostra de leite

Foram colhidas amostras de leite, oriundas de 12 vacas em lactação da raça Jersey, escolhidas aleatoriamente, em diferentes estágios de lactação, com média de produção de 13 litros/vaca/dia, localizados nas dependências do CPRA, região metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, no período de janeiro a dezembro de 2009 (Figura 3).



FIGURA 3 – REBANHO DE VACAS DA RAÇA JERSEY, UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.

Neste rebanho as vacas em lactação eram ordenhadas em sala de ordenha com sistema mecanizado de retirada de leite, manejo de ordenha com princípios agroecológicos (evitando uso de fármacos e demais químicos utilizados para o combate e prevenção da mastite clínica) (Figuras 4 e 5).

A retirada de leite era constituída de duas ordenhas, uma no período matutino e outra no período vespertino com intervalo de 12 horas, com tanque refrigerador e manejo nutricional constituído de regime extensivo com suplementação de concentrado.



FIGURA 4 – SALA DE ORDENHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO.



FIGURA 5 – SALA DE ORDENHA UTILIZADA NO EXPERIMENTO.

A colheita da amostras foi cumulativa ao final das 2 ordenhas completas foram subdivididas em três alíquotas, para a realização das seguintes análises: isolamento bacteriano, determinação da CBT (contagem bacteriana total), da CCS (contagem de células somáticas).

Como o rebanho possuía vacas com diferentes estágios de lactação, foram realizadas quatro coletas mensais por vaca experimental, sendo uma coleta por semana, totalizando 523 amostras.

3.1.3 Amostra de própolis

Diante do fato que a comunidade científica especializada (PARK, IKEGAKI e ALENCAR, 2000; PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO, 2002; BURDOCK, 1998; ALENCAR, 2002; CABRAL, 2008), demonstraram que as propriedades biológicas e composição química das própolis são distintas, optou-se por utilizar uma variedade de própolis em sua forma natural, ou seja, sem prévio beneficiamento, em um total de 5 Kg, adquiridas de um apiário de referência em qualidade da própolis *in natura*, oriunda do município de União da Vitória, com localização geográfica de latitude 26°13' 48" S e longitude de 51°5' 9" W (GOOGLE, 2010).

3.1.4 Micro-organismos

Foram utilizadas cepas padrão de *S.aureus* ATCC 25923 e 88 cepas de *S.aureus* isolados de amostras de leite das vacas experimentais.

3.1.5 Cromatografia

O conceito de espectrometria de massa é relativamente simples: um determinado composto é ionizado pelo método de ionização, onde os íons são fixados e separados em cada base modificada relacionada (método de separação iônica). Os números de íons representantes para cada unidade de base modificada são representados por um espectro de massa.

Comumente é usado o modo de ionização por impacto de elétrons, onde o espectrômetro de massa bombardeia as moléculas do composto na fase de vapor com um feixe de alta energia de elétrons e esses registros resultam em espectro de íons positivos que estão associados nas bases modificadas separadas (SILVERTIEN, WEBSTEIR e KIEMLE, 2005). As análises em cromatógrafo gasoso

com espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), utilizando um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus.

3.2 MÉTODOS DE ANÁLISE

3.2.1 Realização de higienização dos tetos, utilizando solução hidrossolúvel de própolis no manejo de Pré - imersão e Pós – imersão:

Sendo o iodo um químico utilizado no manejo de ordenha de bovinos leiteiros, foi decidido comparar a eficiência na redução de bactérias mesófilas de superfície dos tetos com a solução de extrato hidrossolúvel de própolis por hidrólise alcalina (EHPHA).

O experimento foi executado, adaptando as metodologias descritas por Brito, Brito e Vernequez (2000) e Finger (2001), como segue:

Um rebanho de 12 vacas lactantes foi distribuído em 02 grupos, de acordo com o método de preparação para a ordenha:

01 - lavagem dos tetos com água, secagem com papel toalha e imersão em solução comercial à base de iodo glicerinado na concentração de 0,5% e secagem com papel toalha descartável (grupo A);

02 - lavagem dos tetos com água, secagem com papel toalha e imersão em solução de extrato hidrossolúvel de própolis, na concentração de e secagem com papel toalha descartável (grupo B);

A coleta dos espécimes clínicos para o isolamento e quantificação das UFC/cm² de cada ducto mamário (teto) foi obtido com "swab" bacteriológico estéril e molde de papel cartolina com abertura central de 1 cm por 1 cm. Para coleta, foram realizados quatro movimentos cruzados sobre uma área de 1cm² na região mediana do teto evitando a região proximal do esfíncter mamário (FINGER, 2001). Após a coleta, cada "swab" foi acondicionado imediatamente em um tubo de ensaio esterilizado, contendo 10mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). Desde o momento

da coleta até a realização dos exames no laboratório, as amostras foram mantidas em recipiente isotérmico, com gelo. Os resultados encontrados em UFC/cm² foram transformados em Log₁₀ UFC/cm² para realização da análise estatística.

3.2.2 Isolamento bacteriano e seleção de cepas de *S.aureus*.

De cada amostra coletada, uma alíquota foi destinada à realização de isolamento e tipificação bacteriana. Estas foram colhidas de todos os quartos mamários sob condições assépticas com prévia limpeza externa dos tetos, utilizando solução de iodo glicerinado na concentração de 0,5% no grupo 01, contendo 6 animais, e extrato hidrossolúvel de própolis por hidrólise alcalina (EHPHA) no grupo 02, também contendo 6 animais, totalizando 523 amostras.

As amostras foram colocadas em tubos de *Vacuntainer* estéreis e mantidas sob refrigeração para o cultivo microbiológico. Foram então submetidas a exames microbiológicos, sendo plaqueadas em ágar MacConkey, ágar Sangue (sangue de carneiro 5%) e ágar Manitol salgado, incubadas a 37°C por 24-48 horas. As colônias foram submetidas a provas bioquímicas e de diferenciação bacteriana quando em crescimento no ágar Manitol salgado (CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001; KONEMAN et al. 2001 e QUINN et al. 2005). As leituras das placas foram procedidas as 24 e 48 horas com a descrição da macromorfologia. A micromorfologia foi executada por meio de esfregaço em lâmina e corada pela Técnica de Gram. A identificação microbiológica foi realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com Koneman et al. (2001) e Quinn et al. (2005).

3.2.3 Contagem bacteriana total (CBT)

A segunda alíquota da mesma amostra, contendo o conservante Azidiol® (BS Pharma, Belo Horizonte) composto por 0,11975mg de azida de sódio e 0,005 mg de cloranfenicol por mL, foi destinada à contagem bacteriana total. As análises foram realizadas em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no equipamento IBC (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997) no laboratório do Programa de Análises de

Rebanhos Leiteiros da Associação Paranaense dos Criadores Bovinos da Raça Holandesa (PARL/APCBRH) em Curitiba/PR.

3.2.4 Determinação da CCS

A terceira alíquota da mesma amostra foi mantida sob refrigeração e adicionada do conservante Bronopol® (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), para contagem de células somáticas no equipamento modelo Somacount 500 (Bentley Instruments Incorporated®, Chaska, MN), por citometria de fluxo (IDF/FIL 148A) (BENTLEY INSTRUMENTS, 1997). As análises foram realizadas em um prazo não superior a 24 horas após a coleta, no laboratório do Programa de Análises de Rebanhos Leiteiros da Associação Paranaense dos Criadores Bovinos da Raça Holandesa (PARL/APCBRH) em Curitiba/PR.

3.2.5 Extração e purificação da própolis de *Apis mellifera*

O processo de extração e purificação dos componentes solúveis da própolis em água foi realizado, adaptando a metodologia descrita por Funayama, Werner e Andrade (2006) que consiste em: obtenção do extrato hidroetanólico própolis (EHEP) e obtenção do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina (EHPHA).

3.2.6 Tratamento da própolis

Para o tratamento da própolis, foram executados 20 procedimentos seqüenciais utilizando 250g de própolis *in natura*, obtida de um apiário de referência, localizado no município de União da Vitória, Estado do Paraná. As amostras foram armazenadas entre 0 e – 5 °C para endurecer e então transformados em pó por meio de um triturador elétrico (Figura6).



FIGURA 6 – APARELHO ELETRÔNICO PARA MOAGEM DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS.

Ao pó resultante, foi adicionado um volume total de 600 mL de etanol hidratado na concentração de 75%. Esta solução foi homogeneizada ocasionalmente, em períodos de 3 horas e a suspensão foi mantida em repouso durante 72 horas de maceração e em seguida, filtrada através de papel de filtro, conforme apresentado na Figura 7.



FIGURA 7 – ETAPA DE MACERAÇÃO DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS.

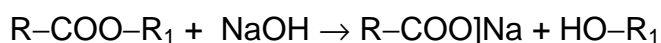
O rendimento foi de aproximadamente 490 mL de extrato hidroetanólico de própolis (EHEP), que foi concentrada por evaporação durante 6 horas. Após evaporação do etanol foram obtidas duas frações: uma fração aquosa e uma fração amarelada constituída de materiais resinosos insolúveis (Figura 8). Cerca de 110g desta última foi lavada com água destilada até que a água de lavagem não apresentasse turbidez.



FIGURA 8 – FRAÇÃO RESINOSA 1 INSOLÚVEL OBTIDO APÓS LAVAGENS SEQUENCIAIS COM ÁGUA DESTILADA.

A fração resinosa 1 foi dissolvida em 150 mL de etanol 99,8% e identificada como solução etanólica de material resinoso (SEMR). O pH da solução foi ajustado para 7,5 com 15 mL de NaOH, na concentração de 2,5 M e armazenadas a -20 °C durante 24 horas. Dessa forma, as reações químicas podem ser esquematizadas conforme abaixo:

* Hidrólise alcalina - - - Reação de saponificação:



Nas Figuras 9 e 10, estão demonstrados os procedimentos de hidrólise alcalina.



FIGURA 9 – TRATAMENTO DA SOLUÇÃO SEMR COM SOLUÇÃO NaOH 2,5M.



FIGURA 10 – REPOUSO E HIDRÓLISE ALCALINA DA SOLUÇÃO.

Após este período, o volume desta mistura hidrolisada foi reduzido pela metade, por evaporação em banho Maria, na temperatura de 41°C, com aeração moderada, e o líquido sobrenadante mais o depósito resinoso foram coletadas, conforme Figuras 11.



FIGURA 11 – EVAPORAÇÃO DA SOLUÇÃO SEMR TRATADA POR HIDRÓLISE ALCALINA.

Os compostos hidrossolúveis liberados por hidrólise alcalina foram coletados a partir do material resinoso, lavando-se cuidadosamente 3 vezes com 50 mL de água destilada, conforma mostrado na Figura 12 e na Figura 13.



FIGURA 12 – SOLUÇÃO RESULTANTE DA LAVAGEM COM AGUA DESTILADA.

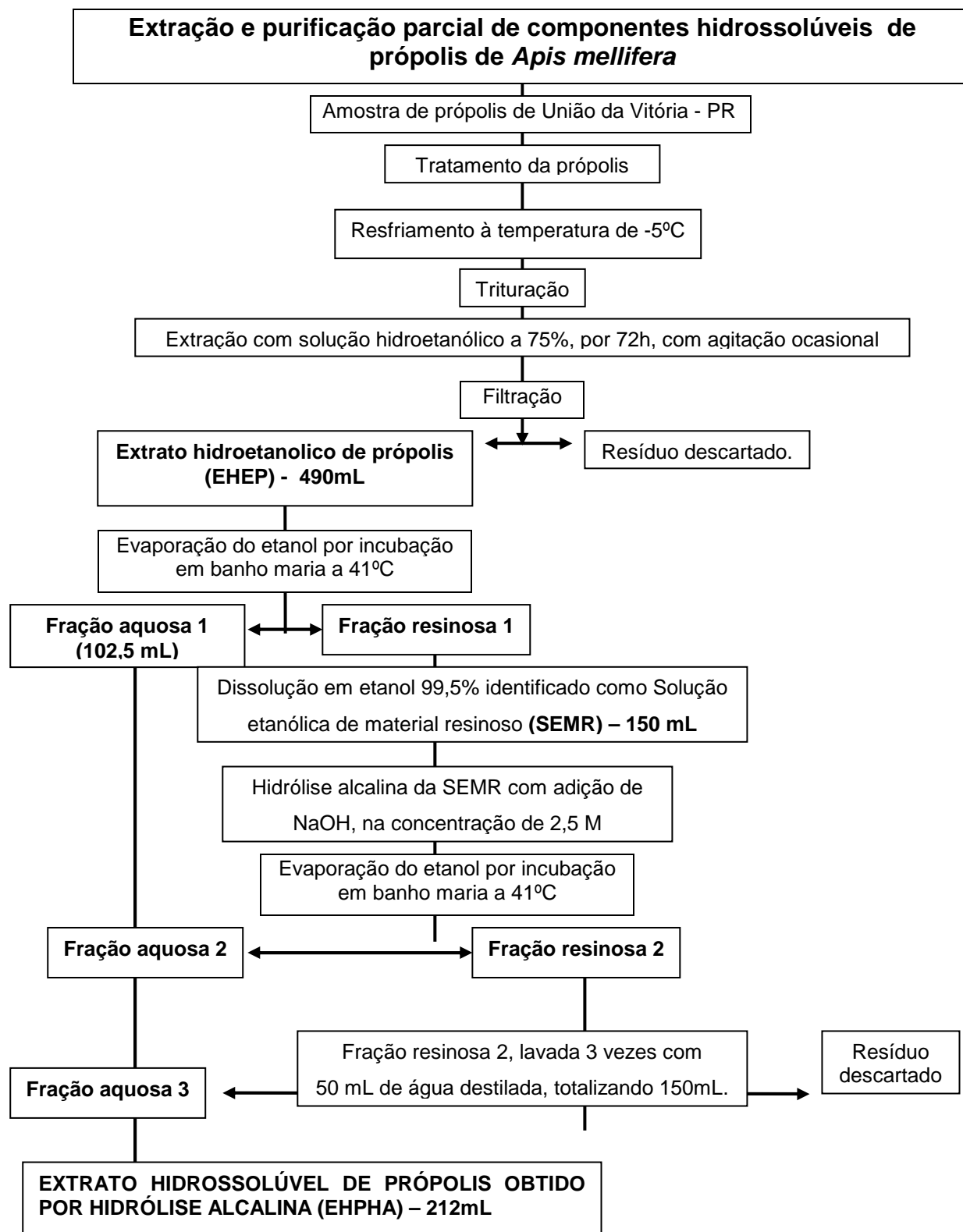


FIGURA 13– FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA – EHPHA.

Todas as frações aquosas, oriundas das lavagens sucessivas na massa de material resinoso, foram adicionadas em recipiente âmbar etiquetado como extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina (EHPHA) para posterior armazenamento.

3.2.7 Preparo de discos impregnados com solução hidrossolúvel e etanólica de própolis

Discos de papel Whatman nº 3 de 5 mm de diâmetro foram padronizados e impregnados com 50 µL de extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina (EHPHA) e 50 µL extrato hidroetanólico de própolis (EHEP). Estes, posteriormente foram secos em estufa a temperatura de 37°C por 6 horas para assegurar a eliminação total de qualquer solvente residual no disco de papel.

A estimativa da susceptibilidade bacteriana aos extratos de própolis foi adaptada de Funayama, Werner e Andrade (2006). No estudo, a atividade específica foi determinada pela inoculação de 0,1 mL de uma cultura pura de *S.aureus* obtidos a partir de suspensões ajustadas para o padrão 0,5 da escala de Mac Farland, em caldo de cultivo Brain Heart Infusion - HIMEDIA^R e em placas de petri contendo o meio de cultivo Müller-Hinton - HIMEDIA^R.

A cepa de *S.aureus* ATCC 25923 e as 88 cepas de *S.aureus* isolados das vacas experimentais foram espalhadas separadamente e distribuídas uniformemente por todas as placas testes com o auxílio de *swab* de algodão estéril.

Os discos impregnados com amostras de própolis foram distribuídos sobre a placa com o auxílio de uma pinça estéril. Desse modo, as placas foram incubadas a temperatura de estufa graduada a 37 °C por 24 horas e a zona de inibição de crescimento da bactéria (halo de inibição) ao redor de cada disco é determinada com o auxílio de um paquímetro e expressa como diâmetro em mm.

3.2.8 Concentração mínima inibitória de EHPHA

Foram distribuídas concentrações seriadas de EHPHA (77-2328µg/mL) em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultivo ágar Müller-Hinton - HIMEDIA^R para testar o crescimento bacteriano. Simultaneamente, placas contendo meio de

cultivo sem EHPHA, foram utilizadas como controle. Dessa forma, 0,1 mL de uma cultura contendo aproximadamente 10^5 células/mL de *S.aureus* ATCC 25923 foi inoculada na superfície da placa e incubadas a 37°C por 24 horas.

3.2.9 Análises cromatográficas

3.2.9.1 *Preparo da amostra*

Foram utilizados 100 mL de EHPHA e 100 mL de EHEP. Estas foram previamente congeladas e levadas ao liofilizador da marca Liotop – L101, por um período de 72 horas a temperatura de - 48 °C (Figura 14).



FIGURA 14 – LIOFILIZADOR UTILIZADO PARA PREPARO DAS AMOSTRAS ANTES DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.

3.2.9.2 *Silanização da amostra*

Primeiramente foi feita a silanização dos vials de vidro por meio de uma reação química entre o agente silanizante e grupos polares da sílica. O agente silanizante (DMCS – di – metilciclosilano) foi usado na concentração de 5%, para reagir com tolueno para modificar a superfície interna do vial, dificultando dessa

forma, a presença de molécula de água que pudesse interferir na estabilidade dos compostos silanizados a serem analisados.

A preparação da amostra derivatizada para cromatografia foi adaptada de PRADO (2009). Foram utilizados 5 mg de amostras liofilizados de EHPHA e 5mg EHEP nos vials previamente tratados. Na sequência as amostras foram adicionadas de 100µL do reagente silanizante *N – Metil – N –(Trimetilsilil) – Trifluoroacetamida* e colocados por um período de 30 minutos em estufa com temperatura de 70°C para que ocorresse a silanização da amostra.

Após este período, o reagente derivatizante foi evaporado e o produto resultante desse tratamento da amostra mais reagente (derivados de trimetilsilil – TMS) foram rediluídos com 1 mL de hexano. Na sequência as amostras silanizadas foram utilizadas para injeção em um cromatógrafo gasoso acoplado com espectrometria de massas (CG-EM), conforme demonstrado na Figura 15.

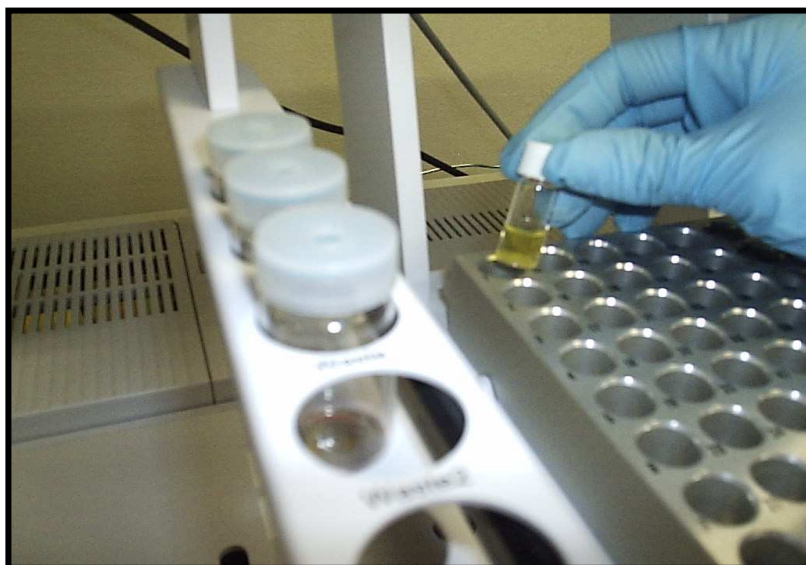


FIGURA 15 – INSERÇÃO DA AMOSTRA SILANIZADA PARA INJEÇÃO NO CROMATOGRAFO GASOSO DA MARCA SHIMADZU - GC 201.

3.2.10 Cromatografia gasosa e espectrometria de massas

As análises em CG-EM foram realizadas utilizando um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus. Seguindo a metodologia descrita por Park et al. (2002), alíquotas de 400 µL dos extratos alcoólicos foram adicionadas a 0,1 mL de *N* – Metil – *N* –(Trimetilsilil) – Trifluoroacetamida para a silanização. As amostras foram separadas em uma coluna capilar (RTX5MS 30 m x 0,25 mm x 0,25µm). A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, durante o primeiro minuto e atingindo 280°C, totalizando 60 minutos de análise. A Figura 16 ilustra o equipamento.



FIGURA 16 - CROMATÓGRAFO GASOSO DA MARCA SHIMADZU - GC 201.

Os componentes presentes nas amostras liofilizadas de EHPHA e EHEP foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa obtidos do CG-EM de padrões autênticos analisados nas mesmas condições. Os padrões utilizados foram: quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ácido p-cúmarico, ácido gálico, ácido cinâmico e ácido ferúlico (Extrasynthese Co., France) e ácidos graxos de 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22 e 24 átomos de carbono, saturados

e insaturados (Sigma Co., USA). Outros compostos foram identificados por meio de perfil de espectros de massas da biblioteca do equipamento (Willey139).

3.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas, foi realizada utilizando o programa computadorizado *Statistica*® (6.0). Para o estudo da contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, Log UFC/cm² pré-imersão dos tetos, Log UFC/cm² pós-imersão dos tetos, adotou-se o delineamento experimental seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + ANI_m + T_n + AN*T_o + e_{mno}.$$

Onde:

Y_{ijkl} = contagem de células somáticas, contagem bacteriana total, Log UFC/cm² pré-imersão dos tetos, Log UFC/cm² pós-imersão dos tetos em função de diferentes efeitos;

μ = média geral do experimento;

ANI_m = efeito de animal (vaca);

T_n = efeito de tratamento aplicado, sendo 1 tratamento com iodo; 2 tratamento com solução contendo EHPHA.

$AN*T_o$ = efeito da interação entre os efeitos ANI e T;

e_{mno} = erro experimental

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTOS BACTERIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE

Do total das 523 amostras, 28 (5,3%) estavam coaguladas e foram descartadas, 52 (9,9%) não apresentaram nenhum tipo de crescimento após incubação a 37°C por até 48 horas e 443 (84,8%) apresentaram crescimento de grupos microbianos. Na Figura 17, está apresentado o perfil microbiano dos 443 isolamentos realizados nos exames microbiológicos.

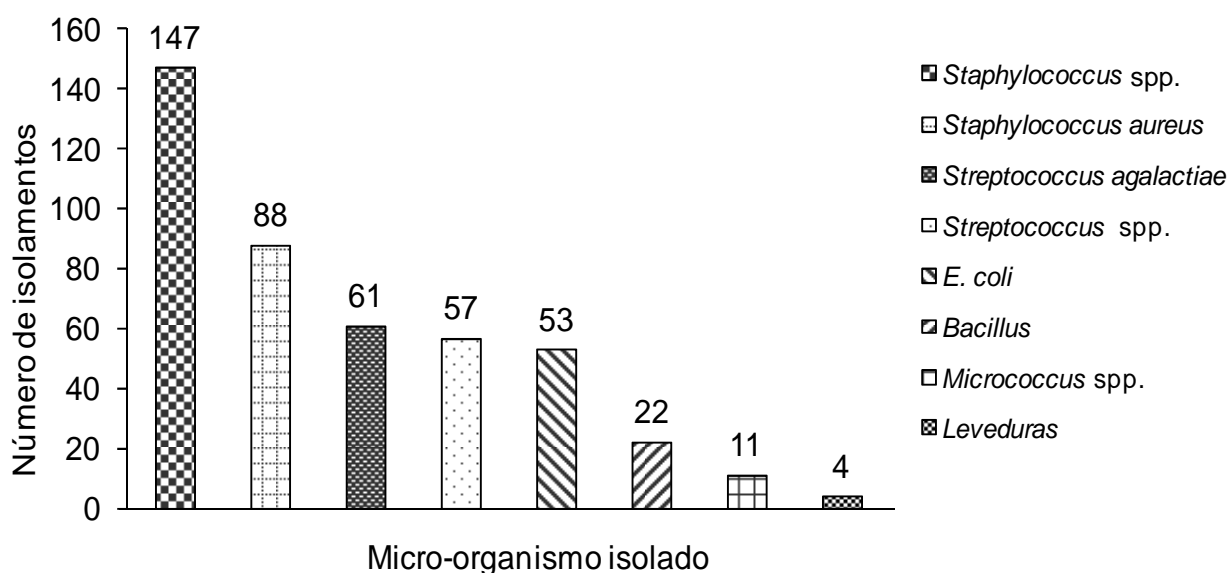


FIGURA 17 - PERFIL DOS 443 ISOLAMENTOS BACTERIANOS EM AMOSTRAS DE LEITE DE UM REBANHO LEITEIRO DA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA.

Nos 443 isolamentos realizados, 87,1% (386 isolamentos) eram bactérias Gram positivas, 11,9% (53 isolamentos) eram bactérias Gram negativas e 1% (4 isolamentos) eram leveduras.

Os micro-organismos isolados com maior frequência foram *Staphylococcus* spp. (33,2%), *S.aureus* (19,86%) e *Streptococcus agalactiae* (13,7%).

Estes resultados confirmam que as cepas de *S.aureus* e demais bactérias do gênero *Staphylococcus* estão presentes na glândula mamária dos bovinos leiteiros, uma vez que, a mesma funciona como ambiente para estes micro-organismos (COSTA, 1995; FONSECA, 1998; CHAPAVAL e PIEKARSKI, 2000; CHI, ANDRADE e FERREIRA, 2001; FORET, AGUERO e JANOWICZ, 2006).

Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Chi, Andrade e Ferreira (2001). Os autores obtiveram os seguintes micro-organismos isolados: *Staphylococcus* spp. (29,5%), *S.aureus* (16%). Nos estudos de Barbalho e Mota (2001), com 43 vacas portadoras de mastite, os micro-organismos mais frequentes no isolamento foram os *Staphylococcus* spp.

Estes resultados também corroboram com os estudos de Jayarao et al. (2004) e Rysanek, Monika e Babák. (2009), que descrevem isolamentos de cepas de *S.aureus*, sendo respectivamente, 39 isolamentos bacterianos em 126 amostras de tanques e 32 isolamentos bacterianos em 268 amostras de tanques.

4.2 AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE EHPHA FRENTE ÀS CEPAS ISOLADAS DE *S.aureus*.

Nas Tabelas 3 e 4, estão sumarizadas as extrações, purificação, a determinação da atividade específica das frações de extratos de própolis sobre culturas puras do micro-organismo *S.aureus* e a determinação da CIM do EHPHA, respectivamente.

TABELA 3 – PURIFICAÇÃO PARCIAL E ATIVIDADE ESPECÍFICA ANTIBACTERIANA DO EHEP E EHPHA FRENTE À CEPA DE *S.aureus* ATCC 25923 E 88 CEPAS DE *S.aureus* ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE DAS VACAS EXPERIMENTAIS.

FRAÇÕES	VOLUME TOTAL (mL)	PESO SECO (mg/50 µl)	MÉDIA E DESVIO PADRÃO	ATIVIDADE ESPECÍFICA (ZONA DE INIBIÇÃO / PESO SECO)
			PARA DIÂMETRO DE HALO	
			DE INIBIÇÃO PARA CULTURAS DE <i>S.aureus</i> (mm)	
EHEP*	490	11,1	12 ± 0,87	1,08
EHPHA**	260	2,3	16 ± 0,44	6,4

*EHEP: extrato hidroetanólico de própolis **EHPHA: extrato hidrossolúvel de própolis por hidrólise alcalina.

TABELA 4 – DETERMINAÇÃO DA CIM DO EHPHA FRENTE À CEPA DE *S.aureus* ATCC 25923.

PLACAS COM ÁGAR Mueller & Hinton (PSa)	EHPHA (mL)	EHPHA (µg/mL)	CULTURAS DE <i>S.aureus</i> CONTENDO 10 ³ cel/mL (mL)	<i>S.aureus</i> (NUMERO DE UFC)
PSa ₀	----	----	0,10	210
PSa ₁	0,05	77,73	0,10	64
PSa ₂	0,10	155,46	0,10	0
PSa ₃	0,20	310,92	0,10	0
PSa ₄	0,30	466,38	0,10	0
PSa ₅	0,40	621,84	0,10	0

PSa –Placas contendo cepas de *S.aureus* ATCC 25923

Como demonstrado na Tabela 3, o EHPHA apresentou uma média e desvio – padrão no diâmetro de halo de inibição superior a média encontrada para o EHEP frente à cepa de *S.aureus* ATCC 25923 e as 88 cepas de *S.aureus* isolados de amostras de leite das vacas experimentais, evidenciando que o tratamento utilizado no processo de purificação da própolis potencializou a ação das propriedades biológicas da própolis.

Na Tabela 4, a inibição total de crescimento de células bacterianas viáveis foi conseguida com o EHPHA na CIM de 155,46 µg/mL, para o micro-organismo *S.aureus* ATCC 25923. Estes resultados concordam com os trabalhos de Menezes et al. (1997), Goulart, Lopes e Martinez (1999) e Fernandes et al. (2001), onde os autores encontraram que o extrato etanólico de própolis em diferentes soluções tem ação contra *S.aureus*.

O resultado é superior a CIM para *S.aureus* obtido nos estudos descritos por Rhajaoui et al. (2001) que foi de 31 µg/mL para o extrato etanólico. Porém, o resultado encontrado (155,46 µg/mL) é mais potente que a CIM relatado por Hegazi e Abd el Hady (2001) que encontraram uma CIM de 2800 µg/ mL para inibição da bactéria *S.aureus*.

A CIM encontrada neste estudo é semelhante aos resultados apresentados por Santos et al. (2002), que encontraram que amostras de própolis tem atividade antimicrobiana, possuindo uma CIM entre 64 e 256 µg/mL.

Os resultados da CIM obtidos neste trabalho mostram que a preparação EHPHA é aproximadamente duas vezes mais potente que aquelas obtidas por Funayama, Werner e Andrade (2006), onde os autores relatam que o extrato hidrossolúvel de Tijucas do Sul – PR possui uma CIM de 291 µg/mL para *S.aureus*.

Em 2009, Bezerra e Gonçalves, relataram que a inibição do crescimento de cepas de *S.aureus* ocorreu a partir das concentrações de 0,0075 g/mL. Estas variações da CIM são devidas às variações específicas da origem da própolis e o método de extração.

Na Figura 18 é possível observar o comportamento de desenvolvimento bacteriano da cepa padrão de *S.aureus* ATCC 25923, quando exposto a concentrações crescentes (10µL, 20µL, 30µL, 40µL, e 50µL) de EHPHA.

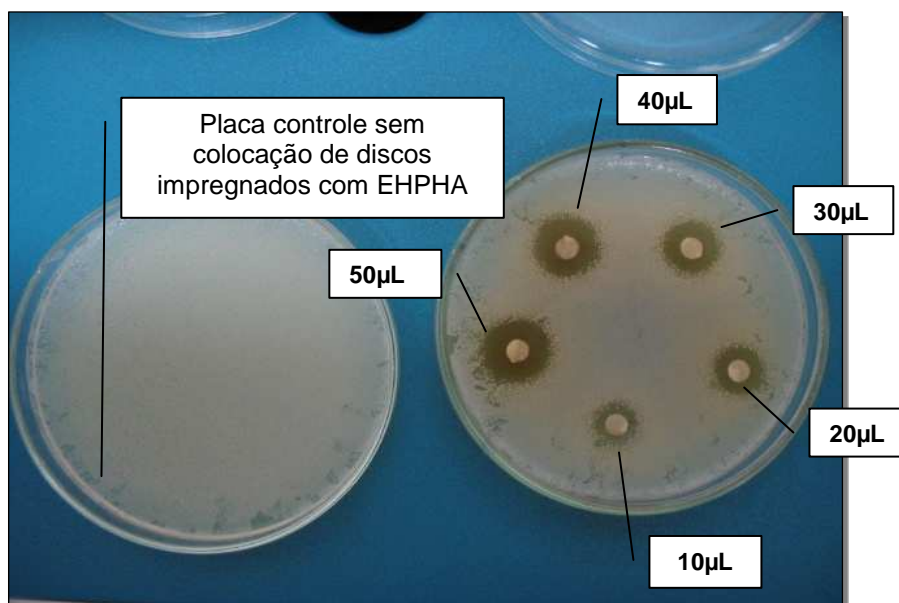


FIGURA 18 – HALO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO POR CONCENTRAÇÕES SERIADAS DE EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA (EHPHA).

Na Figura 19 é possível observar o comportamento de desenvolvimento bacteriano da cepa padrão de *S.aureus* ATCC 25923, quando exposto a 50µL de extrato hidrossolúvel de própolis por hidrólise alcalina (EHPHA) e 50µL de extrato hidroetanólico de própolis (EHEP).

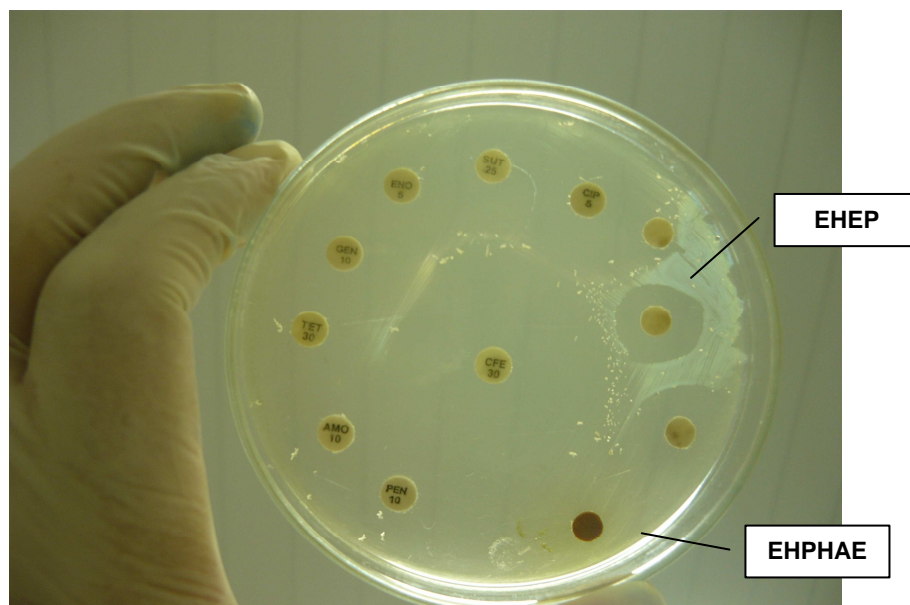


FIGURA 19 – HALO DE INIBIÇÃO PROMOVIDO POR CONCENTRAÇÕES DE EHPHA E EHEP.

Conforme apresentado nas Figuras 19 e 20, o EHPHA possui grande ação inibitória sobre as cepas de *S.aureus*. Os halos de inibição encontrados neste experimento apresentaram uma média e desvio padrão de $16 \pm 0,44$ mm. Estes resultados são superiores aos descritos por Kujumgiev et al. (1999), que relataram diâmetros de inibição para *S.aureus* variando de 11,2 a 12,8 mm.

Estas médias de inibição são potencialmente superiores quando comparadas com os experimentos de Alencar (2002), que utilizando 12 grupos de extratos etanólicos de própolis brasileira obtiveram halos de inibição para cepa padrão de *S.aureus* ATCC 25923 variando de não detectado (0 mm) a 6 mm. Porém, a média apresentada foi inferior quando comparado com o resultado de 18 mm encontrado no estudo de Funayama, Werner e Andrade (2006).

Os resultados apresentados diferem dos resultados apresentados por Pinto, Faria e Message (2001), que verificaram em seus estudos com extrato aquoso de própolis, que componentes de própolis com ação antibiótica não são encontrados em meio aquoso, ou seja, não são hidrossolúveis e os resultados encontrados confirmam que extratos aquosos não exercem nenhum efeito inibidor de crescimento nas cepas de *S.aureus* isolados de amostras de leite.

Da mesma forma, o resultado encontrado difere dos estudos de Park e Ikegaki (1998), uma vez que, os autores relatam que os componentes ativos com capacidade antibacteriana na própolis (fenólicos, flavonóides, ácidos e outros) não são solubilizados pela água, um solvente de alta polaridade. Também observaram que o extrato aquoso de própolis não exibiu atividade antibacteriana sobre espécies Gram-positivas e que quando o solvente utilizado possuía uma porcentagem de água superior a 50%, a atividade antibacteriana do respectivo extrato era menor.

4.3 CROMATOGRAFIA PARA DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES COMPOSICIONAIS PRESENTES NOS EXTRATOS EHEP E EHPHA.

O EHPHA obtido neste estudo apresentou forte ação inibitória sobre as cepas de *Staphylococcus aureus*. Desse modo, a obtenção da solução de EHPHA, baseia-se no fato de que o processo de extração consiste no tratamento alcalino da fração resinosa da própolis possibilitando assim, a liberação de mais compostos inibidores solúveis em água, provavelmente através da hidrólise de ésteres de ácidos graxos com compostos flavonóides e ou de outros conjugados da resina. Nas Tabelas 5 e 6, estão sumarizados os maiores picos de constituintes presentes na fração de EHEP e EHPHA, respectivamente e, nas Figuras 20, 21 e 22 são mostrados os cromatogramas referentes ao EHEP, EHPHA e cromatograma comparativo, respectivamente.

TABELA 5 - PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHEP DE PRÓPOLIS EM CG-EM.

PICO		NOME	ÍON (<i>m/z</i>, abundância em parêntesis)
1	1	ÁCIDO BENZÓICO	179(100) 105(86) 135(70) 77(61) 51(14) 45(9)
2	4	ACIDO BENZENOPROPANOICO	104(100) 75 (74) 73 (39) 207 (31) 91 (24) 222(20)
3	11	ÁCIDO CINÂMICO	131(100) 103(62) 77(48) 51(36) 102 (18)
4	12	INOSITOL	73(100) 345(97) 255(48) 147(34) 346(32) 347(15) 191(12)
5	15	ACIDO-P-CUMÁRICO	73(100) 293(85) 19(80) 249(65) 308(56) 75(22) 45(18)
6	17	INOSITOL TMS ETER	73(100) 318(67) 305(58) 217(56) 147(38) 191(31) 319(24)
7	20	2-METIL-6-(TRIMETILSILIL)BENZOFENONA	253(100) 73(29) 254(22) 209(7) 255(7) 225(6)
8	21	2,2-D2-VANILETILENO GLICOL 3TMS	297(100) 73(51) 298(22) 299(10) 147(9) 209(6)
9	23	ÁCIDO PALMÍTICO	117(100) 73(97) 75(69) 132(42) 129(40) 43(31)
10	25	ÁCIDO FOSFÔNICO	73(32) 219(29) 287(100) 288(22) 396(21) 302(10)
11	27	ÁCIDO OLEICO	73(100) 117(76) 75(75) 129(53) 339(47) 55(45)
12	29	ACIDO 3-CETOADIPICO 3TMS	73(100) 376(65) 271(39) 361(31) 243(27) 69(21)
13	34	5.BETA.-PREGNAN-20-ONE,	143(100) 73(99) 75(40) 81(29) 257(23) 103(21)
14	35	ÁCIDO PIMÁRICO TMS	256(100) 241(54) 73(42) 185(28) 213(23) 257(22)
15	36	METOXI METANDROSTENOLONA TMS	73(100) 143(98) 121(33) 75(28) 81(15) 144(14)
16	41	CHOLEST-4EN-3,26-DIONE 26-ETILENO CETAL	73.(100) 121(31) 75(26) 81(22) 241(19) 107(16)
17	43	4,6-DIHDROXI-5-METOXI-1,8,8,9-TETRAMETIL-7A- [(TRIMETILSILIL)OXI]-8,9-DIHDRO-3H-FENALENO[1,2-B]FURAN- 3,7(7AH)-DIONA (resveratrol)	73(100) 444(58) 69(31) 255(20) 430(19) 445(19)
18	45	7-METIL-2(E)-OCTANO-4,6-DIOL BISTRIMETILSILIL ETER	143(100) 73(84) 462(34) 463 (16) 144(13) 75(9)

TABELA 5 - PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHEP DE PRÓPOLIS EM CG-EM (Continuação).

19	49	5,12-NAFTACENODIONA, 8-ACETIL-8-[[[(1,1-DIMETILETIL)DIMETILSILIL]OXI]-2-FLUORO-7,8,9,10-TETRAHIDRO-6-HIDROXI-11-METOXI	443 (100) 73(84) 131(42) 444(36) 69 (21) 75(18)
20	55	DERIVADO DO ÁCIDO LEVULÍNICO -TMS	73(100) 143(50) 283(18) 532(16) 69(15) 75(11)

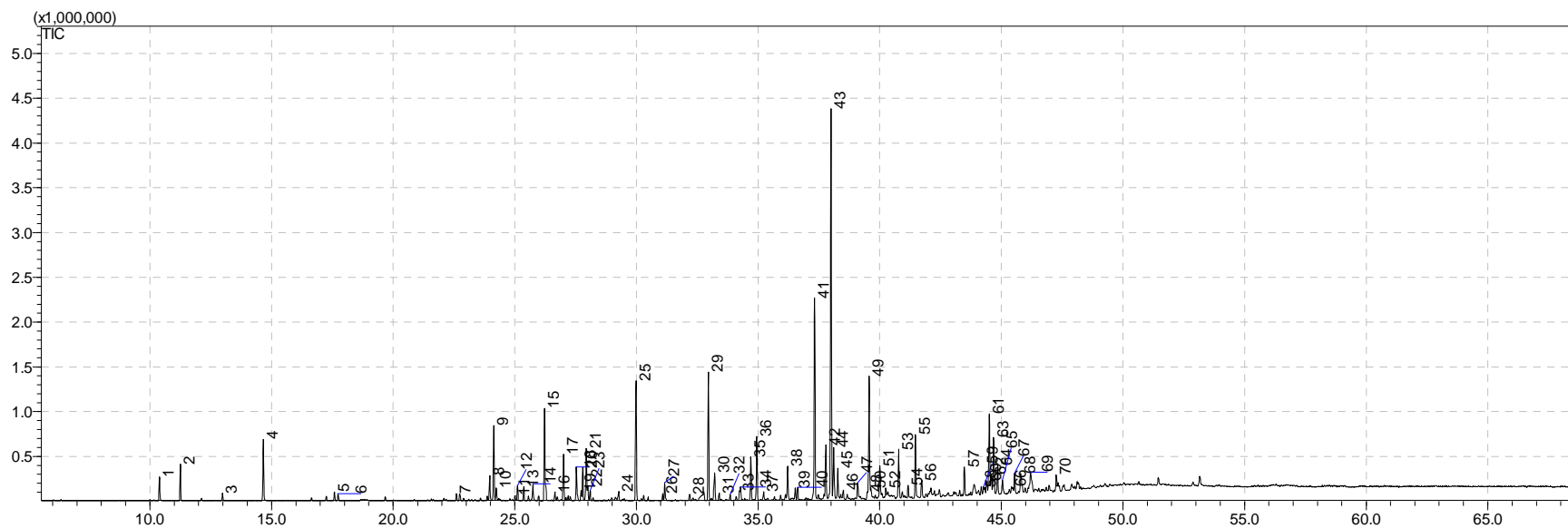


FIGURA 20- CROMATOGRAMA REFERENTE AO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EHEP).

TABELA 6 - PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHPHA EM CG-EM.

PICO	NOME	ÍON (<i>m/z</i> , abundância em parêntesis)
1	ÁCIDO BENZÓICO - TMS	179(100) 105(86) 135(70) 77(61) 51(14) 45(9)
2	3,7-DIOXI-2,8-DISILANONA	73(100) 148(69) 206(51) 117(33) 103(31) 219(17)
3	ÁCIDO PROPANICO, 2,3-BIS[(TRIMETILSILIL)OXI]	73(100) 147 (52) 293(32) 103(22) 133(17)
4	ÁCIDO BENZENOPROPANÓICO, TRIMETILSILIL ESTER	104(100) 75 (74) 73 (39) 207 (31) 91 (24) 222(20)
5	ÁCIDO HIDROCINÂMICO	179(100) 192(77) 73(56) 311(21) 75(17) 180(16)
6	(4-HIDROXI-3-METOXIFENIL)ETILENO GLICOL TRIS(TRIMETILSILIL) ETER	297(100) 73(99) 423(41) 424(37) 298(27) 206(22)
7	DEOXIINOSITOL	73(100) 345(97) 255(48) 147(34) 346(32) 347(15) 191(12)
8	ÁCIDO-P-CUMÁRICO	73(100) 293(85) 19(80) 249(65) 308(56) 75(22) 45(18)
9	INOSITOL TMS ETER	73(100) 318(67) 305(58) 217(56) 147(38) 191(31) 319(24)
10	2-METIL-6-(TRIMETILSILIL)BENZOFENONA	253(100) 73(29) 254(22) 209(7) 255(7) 225(6)
11	2,2-D2-VANILETILENO GLICOL 3TMS	297(100) 73(51) 298(22) 299(10) 147(9) 209(6)
12	ÁCIDO PALMÍTICO, TRIMETILSILIL ESTER	117(100) 73(97) 75(69) 132(42) 129(40) 43(31)
13	ÁCIDO FOSFÔNICO, FENIL, BIS(TRIMETILSILIL) ESTER	73(32) 219(29) 287(100) 288(22) 396(21) 302(10)
14	ÁCIDO OLEICO, TRIMETILSILIL ESTER	73(100) 117(76) 75(75) 129(53) 339(47) 55(45)
15	ÁCIDO 3-CETOADIPICO 3TMS	73(100) 376(65) 271(39) 361(31) 243(27) 69(21)
16	5.BETA.-PREGNAN-20-ONA, 3.ALPHA.,21-BIS(TRIMETILSILILOXI)	143(100) 73(99) 75(40) 81(29) 257(23) 103(21)
17	ÁCIDO PIMÁRICO, TMS	256(100) 241(54) 73(42) 185(28) 213(23) 257(22)
18	METANDROSTENOLONA METOXI TMS	73(100) 143(98) 121(33) 75(28) 81(15) 144(14)
19	CHOLEST-4EN-3,26-DIONE 26-ETILENO CETAL	73.(100) 121(31) 75(26) 81(22) 241(19) 107(16)

TABELA 6 - PERFIL DOS CONSTITUÍNTES E ÍONS MAIS IMPORTANTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHPHA EM CG-EM (Continuação).

20	4,6-DIHDROXI-5-METOXI-1,8,8,9-TETRAMETIL-7A- [(TRIMETILSILIL)OXI]-8,9-DIHIDRO-3H-FENALENO[1,2 J RAN- 3,7(7AH)-DIONA (resveratrol)	73(100) 444(58) 69(31) 255(20) 430(19) 445(19)
21	7-METIL-2(E)-OCTANO-4,6-DIOL BISTRIMETILSILIL ETÉR	143(100) 73(84) 462(34) 463 (16) 144(13) 75(9)
22	5,12-NAFTACENODIONA, 8-ACETIL-8-[[1,1- DIMETILETIL)DIMETILSILIL]OXI]-2-FLUORO-7,8,9,10- TETRAHIDRO-6-HIDROXI-11-METOXI	444(100) 73(93) 131(77) 445(37) 69(19) 445(18)
23	DERIVADO DO ÁCIDO LEVULÍNICO -TMS	73(100) 143(50) 283(18) 532(16) 69(15) 75(11)
24	BENZENOACETAMIDA, 3-METOXI-N-(TRIMETILSILIL)-4- [(TRIMETILSILIL)OXI]	253(100) 73(62) 455(28) 254(21) 209(20) 456(14)

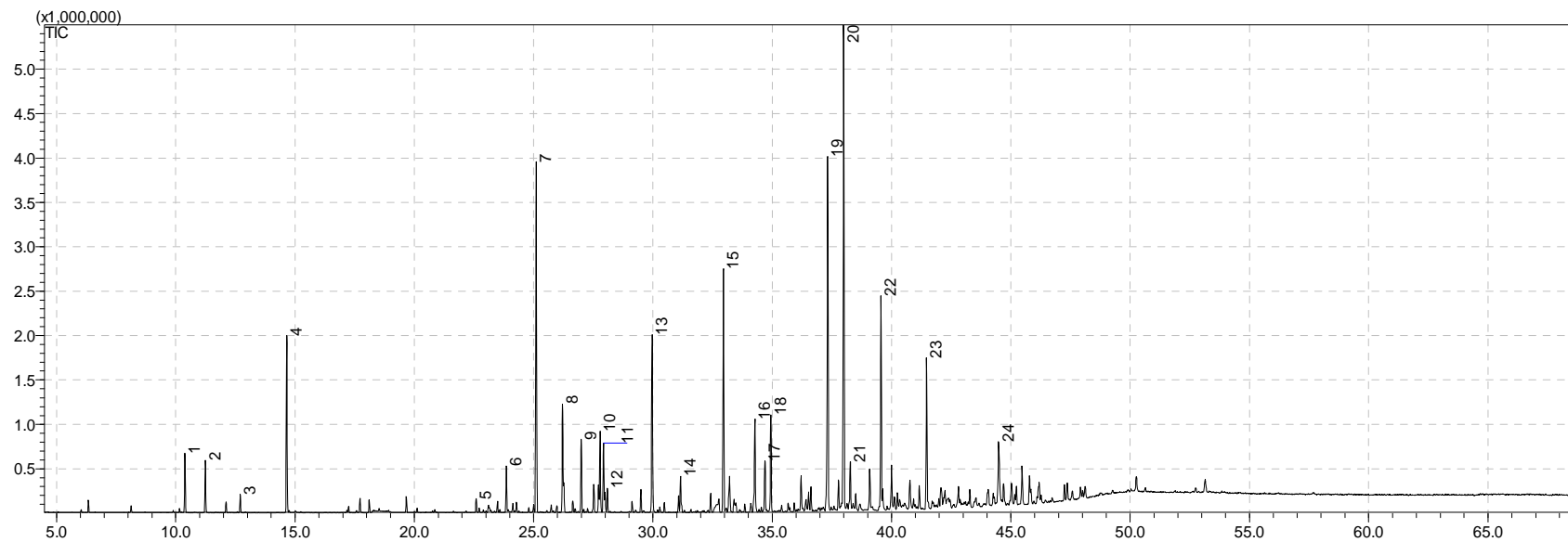


FIGURA 21 - CROMATOGRAMA OBTIDO POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA COM ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE PRÓPOLIS POR HIDRÓLISE ALCALINA (EHPHA).

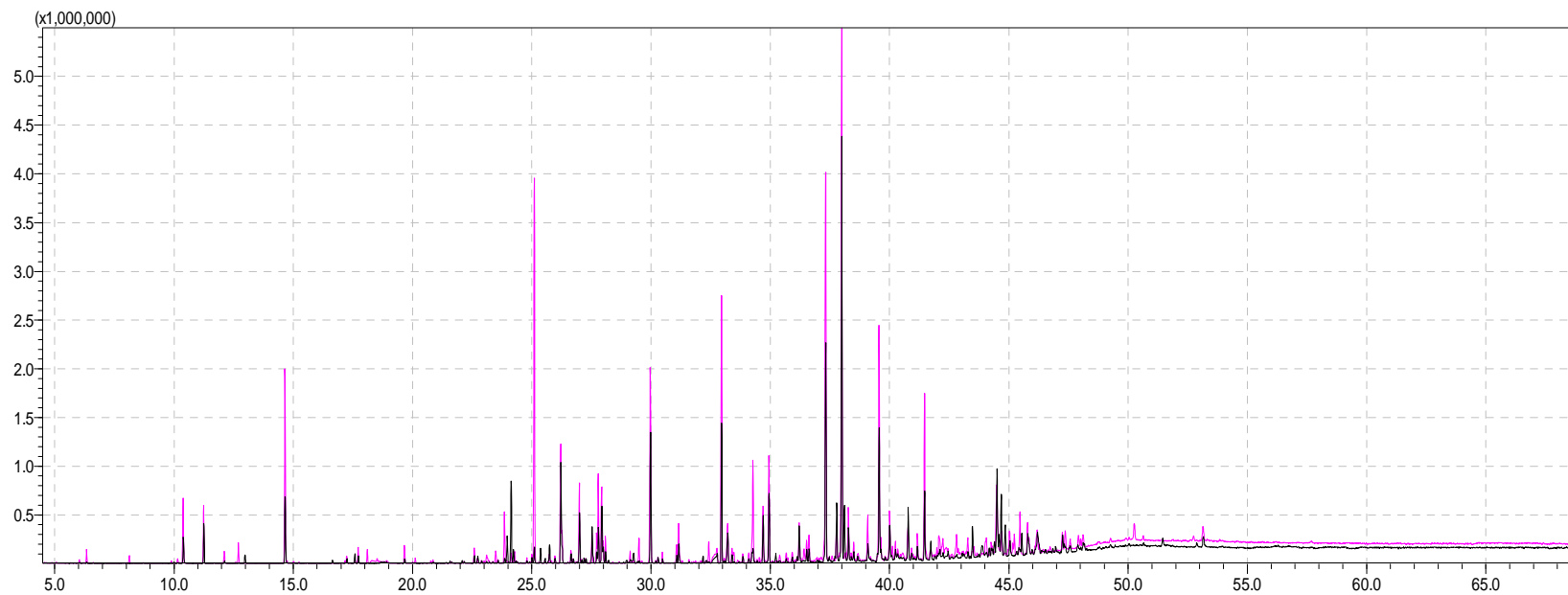
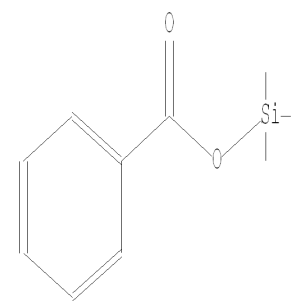
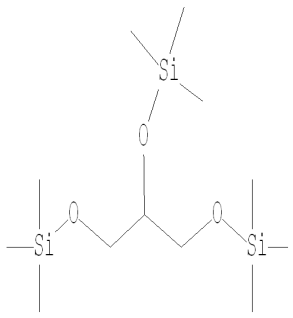
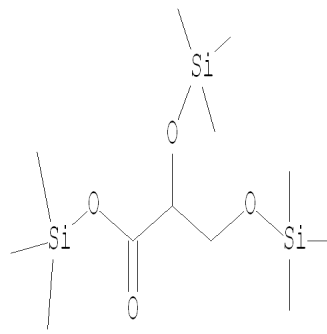
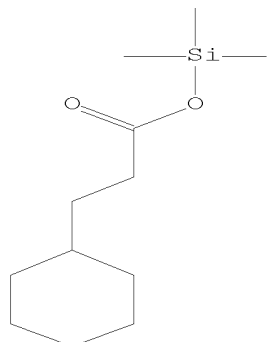
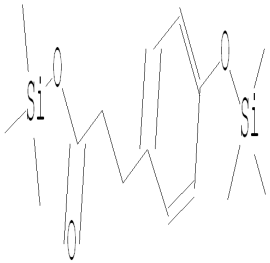
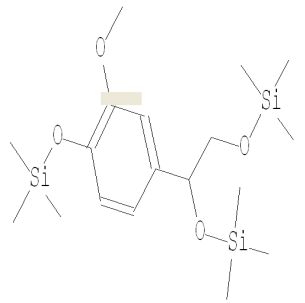
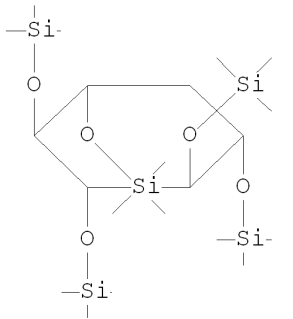
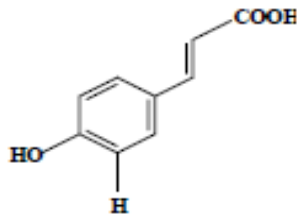
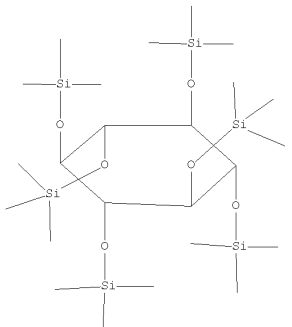

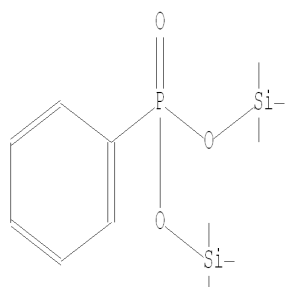
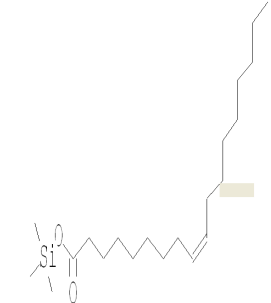
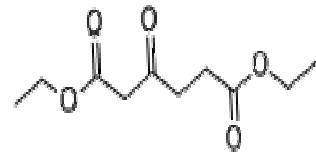
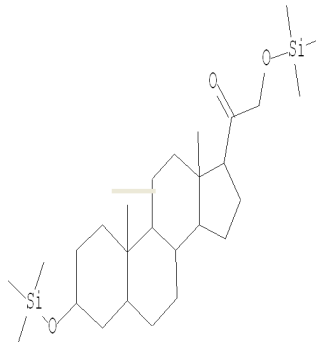
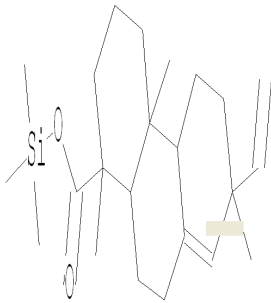
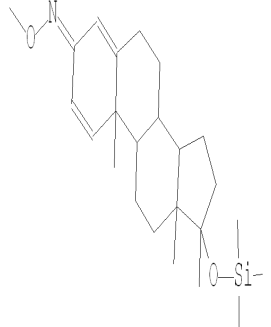
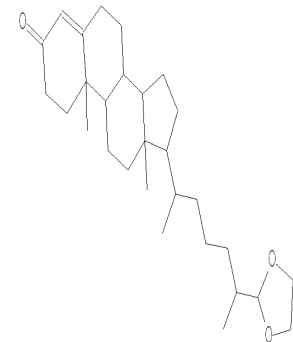
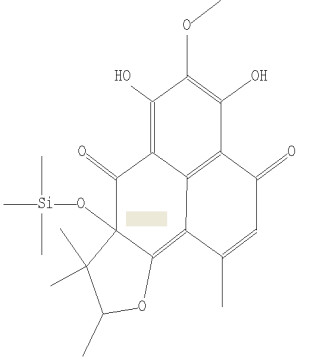


FIGURA 22 - SOBREPOSIÇÃO DOS CROMATOGRAMAS REFERENTES AO EHPHA E EHEP.

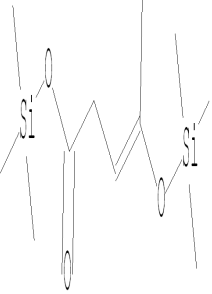
QUADRO 1 – PERFIL DOS PRINCIPAIS CONSTITUÍNTES PRESENTES NOS ESPECTROS DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DOS EHEP E EHPHA EM CG-EM, DA REGIÃO DE UNIÃO DA VITÓRIA, ESTADO DO PARANÁ.

				
Derivado do ácido benzóico	3,7-Dioxi-2,8-Disilanonana	Ácido propanóico, 2,3-Bis[(Trimetilsilil)oxi]	Ácido benzenopropanóico, Trimetilsilil ester	Ácido hidrocinâmico
				2-Metil-6-(Trimetilsilil)Benzofenona
4-hidroxi-3-metoxifeniletileno glicol tris(trimetilsilil) eter	Deoxiinositol	Ácido-P-Cumárico	Inositol TMS eter	

QUADRO 1 – PERFIL DOS CONSTITUÍNTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHEP E EHPHA EM CG-EM, DA REGIÃO DE UNIÃO DA VITÓRIA, ESTADO DO PARANÁ (Continuação).

2,2-D2-Vaniletileno Glicol 3tms				
	Acido Palmítico, Trimetilsilil Ester	Acido Fosfonico, trimetilsilil, Bis(trimetilsilil) Ester	Acido Oleico, trimetilsilil Ester	Acido 3-Ceto adipico 3tms
				
5.Beta.-Pregnan-20-Ona, 3.Alpha.,21-Bis(trimetilsililoxi)	Acido Pimárico, Tms	Metandrostenolona Metoxi Tms	Cholest-4en-3,26-Dione 26- Etileno Cetal	4,6-Dihidroxi-5-Metoxi-1,8,8,9- Tetrametil-7a-[(Trimetilsilil)Oxi]-8,9- Dihidro-3h-Fenalenol[1,2-B]Furan- 3,7(7ah)-Diona (Resveratrol)

QUADRO 1 – PERFIL DOS CONSTITUÍNTES PRESENTES NO ESPECTRO DE MASSA DE COMPOSTOS SILANIZADOS DO EHEP E EHPHA EM CG-EM, DA REGIÃO DE UNIÃO DA VITÓRIA, ESTADO DO PARANÁ (Continuação).

7-Metil-2(E)-Octano-4,6-Diol Bistrimetilsilil Eter	5,12- Naftacenodiona, 8-Acetil-8-[[[1,1-Dimetiletil)Dimetilsilil]Oxi]-2-Fluoro-7,8,9,10-Tetrahydro-6-Hidroxi-11-Metoxi.		Benzenoacetamida, 3-Metoxi-N-(Trimetilsilil)-4-[(Trimetilsilil)Oxi]
		Derivado do Acido Levulínico -Tms	

Na comparação dos cromatogramas referentes ao EHEP e EHPHA, observa-se que o processo de extração por hidrólise alcalina sobre o SEMR propiciou uma purificação e conseqüente concentração dos seguintes componentes no EHPHA:

- a. Ácido benzóico,
- b. Ácido benzenopropanóico,
- c. Deoxiinositol,
- d. Derivado do ácido fosfônico,
- e. Derivado do ácido cetoadípico,
- f. Cholest-4en-3,26-Dione 26-Etileno Cetal
- g. 4,6-Dihidroxi-5-Metoxi-1,8,8,9-Tetrametil-7a-[(Trimetilsilil)Oxi]-8,9-Dihidro-3-Fenalenol [1,2-B] Furan-3,7(7ah)-Diona (Resveratrol),
- h. 5,12- Naftacenodiona, 8-Aceti – 8 - [[(1,1-Dimetiletil) Dimetilsilil] Oxi] – 2 – Fluoro - 7,8,9,10-Tetrahidro-6-Hidroxi-11-Metoxi.
- i. Derivado do ácido levulínico.

Destaca-se ainda, a presença do ácido cinâmico encontrado no EHEP e dos seguintes componentes para EHPHA:

- a. Ácido propanóico,
- b. Ácido palmítico,
- c. Ácido hidrocinâmico e,
- d. Benzenoacetamida - 3-Metoxi-N-(Trimetilsilil)-4-[(Trimetilsilil)oxi].

Foi possível a identificação de componentes comuns tanto para EHEP como EHPHA, sendo eles: ácido cumárico, ácido pimárico, ácido oléico, derivados silanizados de 2-metil benzofenona, derivados de vanil etileno glicol.

Diante dos resultados apresentados nos cromatogramas e nas Tabelas 5 e 6, não foram identificados componentes como sendo flavonóides e derivados de flavonas. Porém, a presença de ésteres de ácidos graxos e compostos aromáticos diversos foram frequentes.

Desse modo, a provável ação antibacteriana do EHPHA frente às cepas de *S.aureus* testadas, está associada não à presença de flavonóides, e sim, à presença de ácidos graxos e/ou compostos aromáticos.

Nos estudos de Alencar (2002), uma das amostras analisadas em seus experimentos (própolis do nordeste brasileiro), apresentou alta atividade antibacteriana contra cepas de *S.aureus*, apesar de não apresentar flavonóides em sua composição química. Resultado semelhante foi descrito por Castro et al. (2007), utilizando também uma amostra de própolis oriunda da região do nordeste brasileiro. Entretanto, apesar da própolis nordestina apresentar forte atividade antibacteriana durante o período estudado, não apresentou altos teores de flavonóides e compostos fenólicos, sugerindo que a atividade antimicrobiana desta própolis não está relacionada com a presença de flavonóides e compostos fenólicos tradicionalmente presentes em outros tipos de própolis brasileira.

Estes resultados discordam dos encontrados por Pinto, Faria e Message (2001), onde os mesmos demonstraram não existir ação antibacteriana no extrato aquoso. Uma possível explicação do insucesso dos referidos autores consiste no fato que o processo de extração de princípios ativos de extrato aquoso de própolis foi realizado por meio de um fracionamento seqüencial, utilizando-se os seguintes solventes extratores: segundo uma ordem decrescente de polaridade: água, etanol, metanol, acetato de etila e clorofórmio, numa concentração de 10% (p/v).

A presença de ácido hidrocinâmico, ácido benzóico, palmítico e derivados do ácido cumárico no EHPHA são semelhantes aos componentes encontrados em extratos de própolis descritos na literatura (ALENCAR, 2002; KARTAL, KAYA e KURUCU, 2002; PARK et al. 2002; CASTRO et al. 2007 e KUMAR et al. 2010).

De acordo com Aga et al. (1994) a atividade antibacteriana é devido à presença do ácido hidrocinâmico.

Alencar (2002), também identificou o ácido hidrocinâmico e demonstrou que a presença ou ausência não necessariamente está associada à ação antibacteriana do extrato de própolis.

Porém, Kujumgiev et al. (1999) e Alencar (2002), concordam que a ação antibacteriana de seus extratos está associada a uma somatória de fatores e que

não há necessidade dos extratos possuírem em seus componentes a presença de compostos flavonóides.

4.4 MEDIDAS DESCRITIVAS

4.4.1 Influencia do Animal (vaca) e dos Tratamentos 1 (iodo glicerinado 0,5%) e tratamento 2 (EHPHA) sobre as características CCS, CBT, Log UFC/cm² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² Pós-imersão dos tetos.

As médias e os respectivos desvios-padrão da CCS, CBT e o perfil de isolamento em log UFC/cm², estão descritos nas Tabelas 7.

TABELA 7 – NÚMERO DE OBSERVAÇÕES (N), MÉDIAS ESTIMADAS, DESVIOS - PADRÃO (DP) DAS CCS, CBT E Log UFC/cm² REFERENTE À PRÉ-IMERSÃO E PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.

CARACTERÍSTICA ANALISADA	N	Média	Desvio - Padrão
CCS (células x mL ⁻¹)	523	565.973	476.806
C.B.T. (células x mL ⁻¹)	523	17.908	4.010
Log UFC/cm ² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS	523	3,56	0,84
Log UFC/cm ² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS	523	2,47	0,80

Conforme mostrado na Tabela 7, a média de CCS foi de 565.973 células/mL, com desvio – padrão de 476.805 células/mL. Este desvio – padrão alto pode ser explicado pelo sistema de manejo de rebanho empregado nas dependências do CPRA, que consiste num sistema agroecológico, ou seja, sem uso de medicamentos para tratamento de mastite.

Os valores encontrados neste estudo estão acima dos valores descritos por Lorenzetti (2006), que encontrou médias de 407.380 células/mL e 389.045 células/mL para amostras de leite cru na região de Curitiba e do Alto Vale (SC), respectivamente e de Paula et al. (2004) que obtiveram a média de 467.750 células/mL em 257.540 amostras de leite de tanques de Santa Catarina, Paraná e

São Paulo.

Os resultados encontrados também são superiores quando comparados com os resultados de Vallin et al. (2009), que descrevem uma média de 255.333 células/mL em amostras de leite não refrigeradas, oriundas de rebanhos ordenhados mecanicamente.

Altas CCS representam significativas perdas em produção, devido à formação de tecido cicatricial na região alveolar, em substituição ao epitélio secretor da glândula mamária (BLOWEY e EDMONDSON, 1999).

A contagem bacteriana total (CBT) apresentou média de 4,21 \log_{10} UFC x mL⁻¹, que corresponde a 17.908 UFC/mL. Este resultado é considerado apropriado pelos critérios da I.N. 51/2002, que estabelece 5,87 \log_{10} UFC x mL⁻¹ como limite máximo de CBT (BRASIL, 2002).

O resultado encontrado é inferior quando comparados com os resultados de Vallin et al. (2009), que descrevem uma média de 59.000 células/mL e 110.000 células/mL em amostras de leite não refrigeradas, oriundas de rebanhos ordenhados manualmente e mecanicamente, respectivamente.

Na Tabela 8, estão sumarizados os valores referentes ao resumo da análise de variância dos efeitos de animal (vaca) e tratamento sobre as características CCS, CBT, Log UFC/cm² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² Pós-imersão dos tetos obtidos pelo modelo matemático.

TABELA 8 – RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS EFEITOS DE ANIMAL (VACA) E TRATAMENTO SOBRE A CCS, CBT, Log UFC/cm² DE PRÉ-IMERSÃO E PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.

Variáveis	Graus de Liberdade	F Tipo III	Probabilidade
ANIMAL (VACA)	11	5.408	0,0001*
TRATAMENTO	1	3.642	0,0009*

* Os efeitos testados foram altamente significantes ($p < 0,01$)

Os efeitos testados foram significativos sobre a CCS, CBT, Log UFC/cm² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² Pós-imersão dos tetos. Dessa forma, a avaliação dos testes das médias ajustadas pelo modelo foi realizada pelo teste de Tukey.

Nas Tabelas 9 e 10, estão sumarizados os valores encontrados pelo modelo estatístico, referentes às características CCS, CBT, Log UFC/cm² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² Pós-imersão dos tetos, de acordo com a variável: efeito animal.

TABELA 9 - TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS CCS E CBT.

NÚMERO DA VACA e TRATAMENTO	CCS (células x mL-1)	NÚMERO DA VACA e TRATAMENTO	C.B.T. (células x mL-1)
42(T2)	241.167 a	42(T2)	6.000 a
38(T1)	290.083 a	24(T1)	8.166 a
24(T1)	342.250 a	38(T1)	9.500 a
13(T2)	389.750 a	5(T2)	10.250 a
22(T1)	415.750 a	36(T2)	10.750 a
34(T1)	444.500 ab	34(T1)	12.416 a
36(T2)	462.833 abc	13(T2)	12.833 a
18(T1)	562.417 abc	22(T1)	13.166 a
5(T2)	643.833 abc	2(T1)	21.000 ab
19(T2)	825.167 bc	19(T2)	21.083 ab
2(T1)	875.500 cd	18(T1)	30.583 ab
3(T2)	1.122.304 d	3(T2)	56.347 b

*letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

**T1= Tratamentos 1 (iodo glicerinado 0,5%) e T2= tratamento 2 (EHPHA)

***CCS: Contagem de células somáticas e CBT: Contagem Bacteriana Total

TABELA 10 - TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS Log UFC/cm² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.

NÚMERO DA VACA e TRATAMENTO	Log UFC/cm ² PRÉ- IMERSÃO DOS TETOS	NÚMERO DA VACA e TRATAMENTO	Log UFC/cm ² PÓS- IMERSÃO DOS TETOS
2(T1)	3,15 a	2(T1)	1,89 a
38(T1)	3,28 a	36(T2)	2,25 ab
5(T2)	3,35 a	5(T2)	2,30 ab
36(T2)	3,44 a	38(T1)	2,32 ab
18(T1)	3,53 a	22(T1)	2,34 ab
42(T2)	3,61 a	24(T1)	2,36 ab
24(T1)	3,62 a	42(T2)	2,51 ab
22(T1)	3,65 ab	18(T1)	2,59 ab
34(T1)	3,68 ab	3(T2)	2,61 ab
19(T2)	3,71 ab	19(T2)	2,62 ab
13(T2)	3,79 ab	34(T1)	2,78 ab
3(T2)	3,84 ab	13(T2)	2,82 b

**letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

**T1= Tratamentos 1 (iodo glicerinado 0,5%) e T2= tratamento 2 (EHPHA)

Os resultados mostram que as médias de CCS, CBT, Log UFC/cm² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS e Log UFC/cm² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS em função do efeito de animal, variou de 241.167 células x mL⁻¹ (vaca 42 (T2)) a 1.122.304 células x mL⁻¹ (vaca 03(T2)), de 6.000 células x mL⁻¹ (vaca 42 (T2)) a 56.347 células x mL⁻¹ (vaca 03 (T2)), de 3,15 LogUFC/cm² (vaca 2 (T1)) a 3,84 LogUFC/cm² (vaca 03 (T2)), de 1,89 LogUFC/cm² (vaca 2 (T1)) a 2,82 LogUFC/cm² (vaca 13 (T2)), respectivamente.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que apesar da variação das médias, para as diferentes características estudadas, quando relacionados os efeitos de animal e tratamento, os animais demonstram médias semelhantes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05) entre os animais com tratamentos diferentes.

Os resultados referentes às características CCS, CBT, Log UFC/cm² de Pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² Pós-imersão dos tetos, de acordo com a variável tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) e tratamento 2 (EHPHA), estão sumarizados nas Tabelas 11 e 12 e FIGURA 24.

TABELA 11 - TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS CCS E CBT.

TRATAMENTO	CCS (células x mL-1)	C.B.T.(células x mL-1)
T1	453.220 ^a	15.330 ^a
T2	679.580 ^b	20.500 ^b

*letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05).

**T1= Tratamentos 1 (iodo glicerinado 0,5%) e T2= tratamento 2 (EHPHA).

TABELA 12 - TESTES DAS MÉDIAS (TUKEY) AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO ASSOCIADOS ÀS CARACTERÍSTICAS Log UFC/cm² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS.

TRATAMENTO	Log UFC/cm ² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS	Log UFC/cm ² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS
T1	3,54 ^a	2,43 ^a
T2	3,61 ^b	2,52 ^b

*letras diferentes na mesma característica e na mesma coluna caracterizam resultados diferentes estatisticamente pelo teste de Tukey (p< 0,05)

**T1= Tratamentos 1 (iodo glicerinado 0,5%) e T2= tratamento 2 (EHPHA).

Na Figura 23, esta sumarizada o comportamento da redução do Log UFC/cm² da pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² para pós-imersão dos tetos em função do efeito de tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) e tratamento 2 (EHPHA).

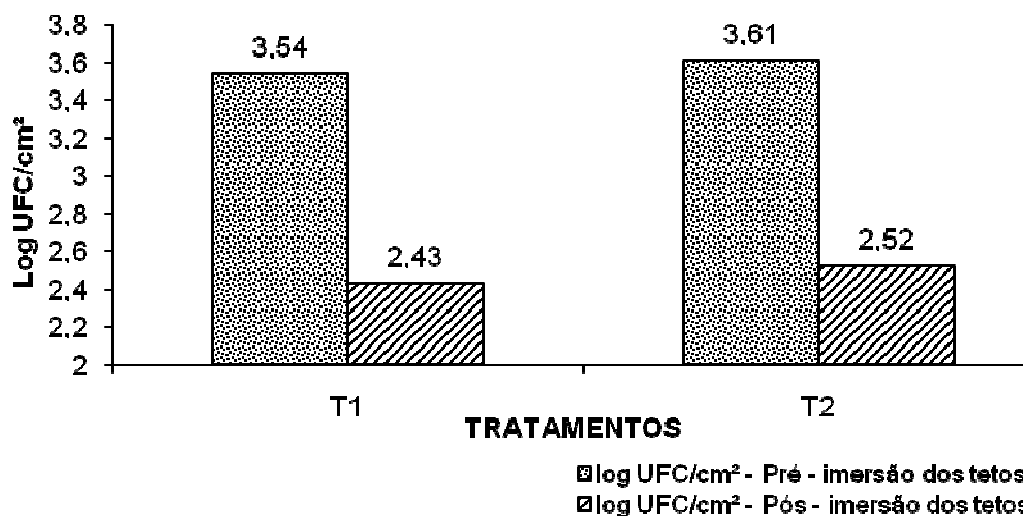


FIGURA 23 - MÉDIAS AJUSTADAS PELO MODELO MATEMÁTICO DO Log UFC/cm² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS E Log UFC/cm² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS EM FUNÇÃO DO EFEITO DE TRATAMENTO.

Os resultados mostram que as médias de CCS, CBT, Log UFC/cm² PRÉ-IMERSÃO DOS TETOS e Log UFC/cm² PÓS-IMERSÃO DOS TETOS em função do efeito de tratamento, foram de 453.220 células x mL⁻¹ (Tratamento 1) e 679.580 células x mL⁻¹ (Tratamento 2), de 15.330 células x mL⁻¹ (Tratamento 1) e 20.500 células x mL⁻¹ (Tratamento 2), de 3,54 LogUFC/cm² (Tratamento 1) e 3,61 LogUFC/cm² (Tratamento 2), de 2,43 LogUFC/cm² (Tratamento 1) e 2,52 LogUFC/cm² (Tratamento 2), respectivamente.

Este efeito de tratamento influenciou significativamente as características avaliadas. Porém, ressalta-se que, mesmo o tratamento 2 (EHPHA) sendo diferente estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em relação ao tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) e quando comparadas com o tratamento 1, evidenciou-se uma tendência de redução da contagem de mesófilos de superfície dos tetos superior a 1 LogUFC/cm².

A presença de UFC/cm² de mesófilos encontrados na superfície dos tetos, mesmo com os procedimentos realizados com tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) e o tratamento 2 (EHPHA), pode ser explicada porque durante o intervalo entre as

ordenhas, as vacas estão deitadas e sujeitas à intensa contaminação da pele dos tetos e do úbere, semelhante aos relatos de Murphy e Boor (2007).

Guerreiro et al. (2005), em seus estudos confirmaram que a cama ou local de permanência dos animais pode abrigar elevadas cargas microbianas, podendo atingir uma contagem bacteriana de 10^8 a 10^{10} UFC/mL.

Ambos os tratamentos apresentaram redução do Log UFC/cm², a redução do Log UFC/cm² da pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² para pós-imersão dos tetos em função do efeito de tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) foi de 31,3% (3,54 Log UFC/cm² para 2,43 Log UFC/cm²) e para o tratamento 2 (EHPHA) foi de 30,1% (3,61 Log UFC/cm² para 2,52 Log UFC/cm²).

Os resultados apresentados na FIGURA 23 e Tabela 12 foram semelhantes aos descritos por Brito, Brito e Vernequez (2000) e Finger (2001), que encontraram uma redução de 4,4 Log UFC/cm² para 2,2 Log UFC/cm² e 1,99 Log UFC/cm² para 1,35 Log UFC/cm² de bactérias mesófilas após a higienização da superfície dos tetos, respectivamente.

Quando comparados os resultados apresentados referentes ao tratamento dos animais com EHPHA com os resultados referentes ao tratamento dos animais com iodo, observou-se que houve confirmação estatística de menor eficiência do tratamento com EHPHA. No entanto, mesmo havendo uma diferença estatística entre o tratamento 1 (iodo glicerinado 0,5%) e o tratamento 2 (EHPHA), quando são comparados os Log UFC/cm² da pré-imersão dos tetos e Log UFC/cm² para pós-imersão dos tetos em função dos efeitos de tratamentos, ambos apresentaram considerável redução do Log UFC/cm² de bactérias mesófilas nas superfícies dos tetos.

5 CONCLUSÕES

- O micro-organismo *S.aureus* foi um dos agentes bacterianos mais comumente isolados em amostras de leite cru.
- A obtenção um extrato hidrossolúvel de própolis, com princípios ativos de ação antibacteriana é possível e, diante dos resultados apresentados, o EHPHA apresentou potencial antibacteriano contra cepas de *S.aureus* e considerável redução do Log UFC/cm² de bactérias mesófilas nas superfícies dos tetos.
- O tratamento do EHEP com hidrólise alcalina da SEMR para obtenção do EHPHA permitiu que fossem possíveis as extrações de compostos hidrossolúveis.
- Foram encontrados diversos compostos no EHPHA, entre eles derivados de ésteres graxos, ácidos aromáticos e outros compostos. Porém, não foi relatada a presença de compostos flavonóides na amostra de própolis oriunda do município de União da Vitória, Estado do Paraná.
- A busca pela produção alternativa de alimentos livres de químicos e agroquímicos coloca o EHPHA como uma alternativa agroecológica para o manejo de pré e pós-imersão dos tetos de bovinos leiteiros, sendo útil para prevenção da mastite bovina.

REFERENCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p 945-946, 1994.

AHN M.; KUMAZAWA S.; USUI Y.; NAKAMURA J.; MATSUKA M.; ZHU F.; NAKAYAMA T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various áreas of China. **Food.Chem.** v.101, p. 1400-1409, 2007.

ALENCAR, S.M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 120p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) -Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

AMARAL L.A.; ISA H.; DIAS L.T.; ROSSI JR, O.D. e NADER FILHO A. Efficiency of the disinfection of teatcups and teats during mechanic milking of dairy cows. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 24(4), p.173-177, 2004.

ANDRADE, M.A. **Mastite Bovina Subclínica: prevalência, etiologia e freqüência de patógenos isolados das mãos de ordenhadores e teteiras, e testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas**. 113p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Goiás, 1997.

ANDRADE, U.V.C. **Fatores ambientais sobre a produção total de leite, gordura e proteína em vacas da raça holandesa na bacia leiteira de Castrolanda, Estado do Paraná**. Curitiba, 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2002.

ANDRADE, U. V. C.; HARTMANN, W.; FUNAYAMA, S.; ALENCAR, S.M. e MASSON, M.L. PROPOLIS OBTAINED BY MEANS OF ALKALINE HYDROLYSIS AND ACTION ON *Staphylococcus aureus* **ARS VETERINARIA**, Jaboticabal - SP v.25, n.3, p.151-154, 2009.

BACILA, M. **Bioquímica Veterinária**. São Paulo: M. Bacila., 1980. p. 434-453.

BANKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896-900, 1998.

BANKOVA V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **J. Ethnopharmacol**, v. 100, p. 114-117, 2005.

BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV,S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O. ; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: Phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v. 23, p. 79-85, 1992.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I. e KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 29, p. 896-900, 1998.

BARBALHO, T.C.F., MOTA, R.A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.2, n.2, 2001.

BARIZON, E; OLIVEIRA, P; FIGUEIREDO, E; FIGUEREDO, LC; BASTOS, JK; SALVADOR, SL. Determinação da atividade antimicrobiana da própolis em solução alcoólica, mel e mel com própolis. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS - **Revista da Universidade de Franca** (I: Franca: 1999). Resumos. Franca: Universidade de Franca, 1999.

BENTLEY INSTRUMENTS INC. **Somacount 300 Operator's Manual**. Chaska: Bentley Instruments Inc. 1997. 116 p.

BEZERRA, A.C.A.; GONÇALVES, G.M.S. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo própolis destinadas à prevenção da acne. **Anais de resumos do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas, 2009**.

BIANCHINI, L.; BEDENDO, I. P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Sci agric Piracicaba**, v. 55, p. 149-152, 1998.

BLOWEY, R., EDMONDSON, P. **Control de la Mastitis en Granjas de Vacuno de Leche**. Zaragoza: Acribia, 208p., 1999.

BODDIE, R.L.; NICKERSON, S.C.; ADKINSON, R.W. Evaluation of teat gennicides of low iodine concentrations for prevention of bovine mastitis by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **Preventive Veterinary**, v. 16, p.111-7, 1993.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O. e SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

BRASIL. **Instrução Normativa n. 51, de 18 de setembro de 2002**. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2002, p. 39.

BRITO, J.R.F.; BRITO, M.A.V.P e VERNEQUEZ, B.R.S. Contagem bacteriana da superfície de tetas de vacas submetidas a diferentes processos de higienização, incluindo a ordenha manual com participação do bezerro para estimular a descida do leite. **Rev. Univ. Fed. Santa Maria**, v.30, n.5, 2000.

BURDOCK, G A. Review of the biological properties and toxicity of propolis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p. 341-363, 1998.

CABRAL, I.S.R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

CARDOSO, V.L.; MONSALVES, F.M.; EL FARO, L. Valores econômicos para ocorrência de mastite clínica e contagem de células somáticas em um sistema intensivo de Produção de Leite. **42ºReunião da Sociedade Brasileira de Zootecnia.** Goiânia, Goiás. Cd-rom. 2005.

CASTRO, M. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quím. Nova** [on-line]. vol.30, n.7, p. 1512-1516, 2007.

CHAPAVAL, L.; PIEKARSKI, P.R.B. **Leite de Qualidade.** Viçosa: Aprenda Fácil, 2000. 195 p.

CHI, K.; ANDRADE, U.; FERREIRA, A. Sanitary program in dairy cattle. **Archives of Veterinary Science** [Online] 6:1, 2004. Disponível: **Erro! A referência de hiperlink não é válida..** Acesso em 02/02/2008.

CONRAD, L. M. e HEMKEN, R. W. Experiment Milk Iodine as Influenced by an Iodophor Teat Dip 1,2. **J. Dairy Sci.** Vol. 61, p. 776-780, 1978

COSTA, E.O. Estudo epidemiológico da mastite clínica bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.21-26, 1995.

COSTA, E.O. **O Fantasma da Mastite.** Pardo-Suíço em Revista. Ed. 39. Anuário 98/99, São Paulo, SP, 1998.

DIAS FILHO, F.C. **Perfil do produtor e características das propriedades rurais que utilizam ordenhadeira mecânica na bacia leiteira de Goiânia-GO.** 1997. 63 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária – Universidade Federal de Goiás, 1997.

DUMAS E. **Activite dermatologique de deux nouveaux produits de trempage du trayon chez la vache laitiere.** 134p. Tese de Doutorado. Ecole nationale veterinaire de Lyon. Lyon, 2004.

ESHRAHGH, S.; VALAFAR, S. Evaluation of inhibitory effects of iranian propolis against filamentous bacteria. **Pak. J. Med. Sci,** vol. 24, nº. 1, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations: essential documents, statistics, maps and multimedia resources. **Value added products from beekeeping** -chapter 5 - PROPOLIS - FAO Agricultural Services Bulletin – 124, 1996

FARIA, J.E. **Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO).** Belo Horizonte: UFMG, 1995. 101 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.

FDA - Food and Drug Administration - *Contains Nonbinding Recommendations Draft — Not for Implementation* Guidance for FDA Staff Compliance Policy Guide Sec. 527.300 Dairy Products - Microbial Contaminants and Alkaline Phosphatase Activity (CPG 7106.08) 2010 Disponível em: www.fda.gov/downloads/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/UCM192468.pdf- Acesso em janeiro de 2010.

FERNANDES JR, A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A. A. H. e SFORCIN, J. M. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 1-9, 2001.

FERNANDES, JR. A.; LOPES, C.A.M.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 3, p. 287-294, 1997.

FINGER, R.M. **Fatores de riscos da higiene de vacas com elevado número de bactérias mesofílicas aeróbias no leite.** Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2001.

FONSECA, L.F.L. **Qualidade do leite e sua relação com equipamento de ordenha e sistema de resfriamento.** I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite. Curitiba, PR, Brasil, pp.54-6, 1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite.** São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FORET, C. J.; AGUERO, H.; JANOWICZ, P. Efficacy of Two Barrier Iodine Teat Dips under Natural Exposure Conditions. **J. Dairy Sci.** v.89, p. 2279–2285, 2006.

FORET, C. J.; OWENS, W.E.; BODDIE, R. L.; JANOWICZ, P. Efficacy of two iodine teat dips during experimental challenge with *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. **J.Dairy Sci.** v. 86, p.3783–3786, 2003.

FOX, L.K.; NAGY, J.A.; HILLERS, J.K.; CRONRATH, J.D.; RATKOWSKY, D.A. Effects of postmilking teat treatment on the colonization of *Staphylococcus aureus* on chapped teat skin. **American Journal of Veterinary Research** 52: 6, 799-802, 1991.

FUNAYAMA, S.; GUGELMIN, C.; GONÇALVES, D.; NASCIMENTO, A. C.; SILVA, C.J.; BORSARI, A.P. Uma nova estratégia imunológica para o diagnóstico de mastite bovina subclínica. **Tuiuti: Ciência e Cultura**, n. 38, p. 43-55, Curitiba, 2006.

FUNAYAMA, S.; WERNER, P. R., ANDRADE, U. V. C. Action of inhibitor compounds on growth cultures of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from propolis of *Apis mellifera*. X Seminário de Pesquisa e IV de Iniciação Científica, **Anais Virtuais da UTP Publicação “on line”**2006.

GONÇALVES, D.; KOZICKI, L .E. Biochemical and immunological profiles during the parturition period in dairy cows, with and without placental retention and mastitis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, 34, 6, 371-382, 1997.

GOULART, C.S.; LOPES, C.A.M.; MARTINEZ, T.C.N. Estudos preliminares sobre a atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE PRÓPOLIS E APITERÁPICOS - Revista da Universidade de Franca (I: Franca: 1999). **Resumos**. Franca: Universidade de Franca, 1999.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A .S.M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222; 2005.

HALASA T, HUIJPS K.; OSTERAS O.; HOGVEEN H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. **Vet. Quart.**, v.29, n.1, p.18-31, 2007.

HARMON, R.J. Fatores que afetam a contagem de células somáticas. In: I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite (I: Curitiba: 1998). **Anais**. Curitiba, p. 08, 1998.

HARTMANN, W. **Características físico-químicas, microbiológicas, de manejo e higiene na produção de leite bovino na região oeste do Paraná: ocorrência de *listeria monocytogenes***, Curitiba, PR, 2009, 76p. Tese de Doutorado – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2009.

HEESCHEN, W.; REICHMUTH, J. Mastitis: influence on qualitative and hygienic properties of milk. In: Third IDF International Mastitis Seminar, 1995, Tel-aviv. **Proceedings...** Book 1, session 3, p.3-13, 1995.

HEGAZI, A.G.; ABD EL HADY, F.K. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical compositions of propolis from reclaimed lands. **Z.Naturforsch.** v. 57, P. 395-402, 2001.

HOFFMAN, F.L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T.M. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Higiene Alimentar**, v.9, n.39, p.29-34, 1995.

HU F.; HEPBURN H.R.; LI Y., CHEN M.; RADLOFF S.E.; DAYA S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol** 100 : 276-283, 2005

JAYARAO B.M.; PILLAI S.R.; SAWANT A.A.; WOLFGANG D.R, HEGDE N.V Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **J. Dairy Sci.** v. 87, p. 3561-3573, 2004.

JONES, G.M. Milking practices recommended to assure milk quality and prevent mastitis. **Dairy Science.** Virginia Cooperative Extension, p.404-227, 1998.

KARTAL, M.; KAYA, S.; KURUCU, S. CG-MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. **Z. Naturforsch**, v. 57, p.905-909, 2002.

KOO, H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; EINN, W. C. **Diagnostic Microbiology**, 5th Ed. Lippincott Company, Philadelphia, p.539- 576, 2001.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, V.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUMAR,N.; MUEEN AHMED, KK; DANG, R. SHIVANANDA, TN; DAS, K. CG-MS - Analysis of propolis of Indian origin. **J. Young pharm** v.01, p. 46-48, 2010.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião, Editora e Gráfica. 2006.

LORENZETTI, D.K. **Influência do tempo e da temperatura no desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos no leite cru de dois estados da região sul**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Paraná. 2006.

MACHADO, C.A., DEMETRIO, P.F., BORGES, C.G. Contagem de células somáticas e produção de leite em vacas holandesas de alta produção. **Pesq. Agrop. Brás.** v.38, n.12, p.1451-1457. 2003.

MACIEJEWICZ, W. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technology**, v. 24, p. 1171-1179, 2001.

MARCUCCI M.C.; FERRERES F.; GARCÍA-VIGUERA C.; BANKOVA V.S.; DE CASTRO S.L.; DANTAS A.P.; VALENTE P.H.M.; PAULINO N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnopharmacol**, v. 74, p.105-112, 2001.

MATSUNO, T.; CHEN, C.; BANET, P. A tumoricidal and antioxidant compound isolated from aqueous extract of propolis. **Medical Science Research**, v.25, p.583-584, 1997.

MENEZES, H.; PRÓPOLIS: UMA REVISÃO DOS RECENTES ESTUDOS DE SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MENEZES, H.; BACCI JR, M.; OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v. 28, p. 71-76, 1997.

MIORIN, P. L.; JUNIOR, N. C. L.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 913-920, 2003.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v. 152, p. 239-246, 1997.

MONARDES, H.G. Las experiencias del Norte, desafios en el Sur. Congresso Holstein de las Américas, 6, 2001, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça holandesa/Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, p. 15 - 26, 2001.

MONARDES, H.G. Programa de Pagamento de Leite por Qualidade em Quebec, Canadá. In: I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite (I: Curitiba: 1998). **Anais**. Curitiba, p 40 - 43, 1998.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R. e VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2. **Anais...**, p. 206-217. Maringá, 2002.

MURPHY, S.C.; BOOR, K.J. **Sources and causes of high bacteria counts in raw milk: An abbreviated review**. 2007: Abbreviated_Review. Disponível em: http://www.extension.org/pages/Sources_and_Causes_of_High_Bacteria_Counts_in_Raw_Milk:_An. Acesso em 02 de janeiro de 2010.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p. 29–33, 2003.

NASCIMENTO, R. **Caracterização do nível de higienização da ordenha do município de Buíque**. Pernambuco: UFRP, p.3, 2007.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility testy; approved standards - N02-A7**, Wayne, PA, 1997.

NMC - National Mastitis Council. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. Madison, 222p, 1998.

CPRA - Centro Paranaense de Referência em Agroecologia. Disponível em: <http://www.cpra.pr.gov.br/>. Acesso em: 20/01/10.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria v.32, p.997–1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 2230-2232, 1998.

PARK, YK; IKEGAKI, M; ALENCAR, SM. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicos e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v.58, p.2-5, 2000.

PARK, Y.K.; KOO, H.M.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current of Microbiology**, v. 36, p. 24-28, 1998.

PAULA, M.C.; RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; ARCE, J.E.; ANDRADE, U.V.C. Contagem de células somáticas em amostras de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, 2004.

PEDRINI S.C.B.; MARGATHO L.F.F. Sensibilidade de micro-organismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biológico**, São Paulo, v.70(4), p.391-395; 2003.

PEREIRA A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** 25: 321-326. 2002.

PHILPOT, WN. Importância da contagem de células somáticas e outros fatores que afetam a qualidade do leite. In: I Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite (I: Curitiba: 1998). **Anais**. Curitiba, p 28 - 35, 1998.

PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. **Vencendo a luta contra a mastite**. 1 ed. Campinas: Westfalia, 2002.

PINTO, M.S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais.** 106p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ, Piracicaba, 2009.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas.** Porto Alegre: Artmed, 2005.

RASMUSSEN M.D.; GALTON D.M. e PETERSSON L.G. Effects of premilking teat preparation on spores of anaerobies bacterias and iodine residues in milk. **J. Dairy Sci.** v.74, p. 2472-2478, 1991.

RHAJAOUI, M.; OURMAZIL, H.; FAID, M.; LYAGOUBI, M.; ELYACHIOUI, M.; BENJOUAD, A. Antibacterial activity of a Moroccan própolis extracts. **Science Letters**, v.3 n.3 2001

RIBAS, N.P.; MONARDES, H.G.; BAJALUK, S. Produções diárias de leite, porcentagens de gordura e proteína em vacas da raça holandesa no Estado do Paraná. **Revista Batavo**, Carambeí, PR, n. 111, p.26 -31, 2002.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p. S21-S29, 2002.

RYSANEK, D.; MONIKA, Z.; BABÁK, V. Major Mammary Pathogens as Contributors to Total Bacterial Counts in Raw Milk. **Acta Vet. Brno**, v.78, p. 455-461, 2009.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; BRAGA, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 1-7, 2002.

SANTOS, C.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 71-74, 2003.

SANTOS M.V.; FONSECA L.F.L. **Estratégias para Controle de Mastite e Melhoria da Qualidade do Leite.** Editora Manole, Barueri. 314p, 2006.

SCHAEFER, S. **Iodo.** Disponível em: http://www.tabela.oxigenio.com/nao_metais/elemento_quimico_iodo.htm. Acesso em: jan. 2009

SFORCIN, J. M.; JR, A. F.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V. e FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.

SILVERTIEN, R.M.; WEBSTEIR, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organics compounds**, Canadá, 7ª ed, 2005.

SORIANO, C.; MICHEO, C.; MENDIEIRA, V.A.; TABERA, A.; STEFANO, A.; CASASNOVAS, G.; PURRÁN, P.; CORRADETTI, A.; CARABAJAL, S. Evaluación de la calidad de leche de tanque de tambos de la Cuenca Mar y Sierras. **Veterinaria Argentina**, v. 18, n. 179, p. 654-667, 2001.

USDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURA. **Dairy:World Markets and Trade/December 2009**. Disponível em < <http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2009/122909dairyfull.pdf>> Acesso em 02/07/2010.

VALLIN, V.M.; BELOTI, V.; BATTAGLINI, A.P.P; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; ANGELA, H.L.; SILVA, L.C.C. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios da região central do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 181-188, 2009.

VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of yhe efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 2000.

WATTIAUX, M. A. **Lactação e ordenha 24**: Mastite: prevenção e detecção. *The Babcock Institute* Disponível em: <http://www.babcock.wisc.edu/?q=node/221> Acesso em: 2008.

WIELSE, H. **Novo Manual de apicultura**. Guaíba - RS, 292p1995.

ZOCHE, F.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J.K.; ROSA, S.T.M.; RAYMUNDO, N.K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.59-67, 2002.